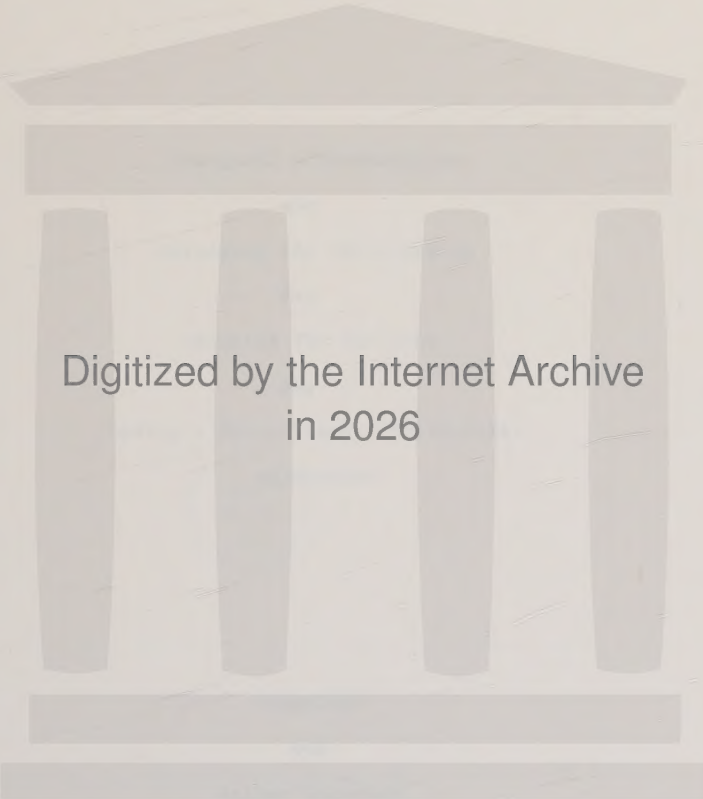


**DIE TRYPTOPHANOXYGENASE AUS
PHORMIA TERRAENOVAE (ROB.-DESV.):
ANREICHERUNG, EIGENSCHAFTEN
UND BEDEUTUNG**

Walter Schartau

—
1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIE TRYPTOPHANOXYGENASE AUS PHORMIA TERRAENOVAE (ROB.-DESV.):

ANREICHERUNG, EIGENSCHAFTEN UND BEDEUTUNG

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

zu München

vorgelegt

von

Walter Schartau

aus

Oberstaufen

Januar 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger
Tag der mündlichen Prüfung: 25. 2. 1974

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen, der durch sein stetes Interesse, seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion und seine wertvollen Anregungen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ferner danke ich herzlich Frau H. Geisert, die mir bei der Fertigstellung des Manuskriptes sehr geholfen hat und Frl. M. Holland, welche die Fliegenzucht versorgte.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	7
I. Tiere	7
II. Chemikalien	7
III. Präparation der Organe	8
IV. Inkubation für die Bestimmung der Aktivität der Tryptophanoxygenase	8
V. Bestimmung des gebildeten Kynurenins	9
VI. Gewinnung der Tryptophanoxygenase aus <i>Phormia terraenovae</i>	10
VII. Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung der Tryptophanoxygenase durch Gelfiltration	10
VIII. Chromatographie der Tryptophanoxygenase über DEAE-Zellulose	10
IX. Isoelektrofocussierung	11
X. Bestimmung der Michaelis-Konstanten für Sauerstoff	12
C. ERGEBNISSE	13
I. VORVERSUCHE	13
1. Standardisierung der BRATTON-MARSHALL-Reaktion	13
2. Nachweis der Insektenoxygenase in den löslichen Fraktionen	16
3. Linearität der Enzymreaktion mit der Zeit und mit der Proteinkonzentration	18
4. Stabilität der Tryptophanoxygenase	19
a. Stabilität des Enzyms in Lösungen	19
b. Stabilität des Enzyms als Ammonsulfatniederschlag	22
c. Acetontrockenpulverpräparationen	22

II. ANREICHERUNGSVERSUCHE	24
1. Protaminsulfatfällung	24
2. Ammonsulfatfällung	25
3. Anaerobe Hitzedenaturierung	25
4. Gelfiltration	26
5. Chromatographie über DEAE-Zellulose	27
6. Isoelektrofocussierung und weitere Versuche	29
III. EIGENSCHAFTEN DER TRYPTOPHANOXYGENASE	
AUS PHORMIA TERRAENOVAE	31
1. Bestimmung des pH-Optimums	31
2. Substratspezifität der Tryptophanoxygenase	32
3. Substratoptimum und allosterische Eigenschaften der Insektenoxygenase	33
4. Versuche zu Dissoziation und Reassoziation der Tryptophanoxygenase	36
5. Bindung von Sauerstoff	38
6. "Lag-Phase" der Tryptophanoxygenase	39
7. Hemmung der Tryptophanoxygenase durch CN^- und Cu^{++}	41
c. Untersuchungen zur Stabilität und Natur des Cofaktors der Insektenoxygenase	42
a. Dialyseversuche	43
b. Hämatin - Cofaktor der Tryptophanoxygenase aus Phormia?	44
c. Spektrum der oxydierten und reduzierten Form der Oxygenase	46
9. Molekulargewichtsbestimmung	47
IV. PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER TRYPTOPHANOXYGENASE IM STOFFWECHSEL VON PHORMIA TERRAENOVAE	49

1. Versuche zur Induktion	49
2. Aktivitätsverlauf der Tryptophanoxygenase während der Entwicklung von Phormia	50
3. Mischinkubationen von Pupal- und Imaginal- enzym	51
4. Verteilung der Tryptophanoxygenase in einzelnen Organen von Phormia	52
D. DISKUSSION	54
1. Vergleich der Eigenschaften der Tryptophan- oxygenase aus Rattenlebern und Bakterien mit dem Insektenenzym	54
2. Bedeutung der Oxygenase im Stoffwechsel von Phormia	61
E. ZUSAMMENFASSUNG	66
F. LITERATUR	68

A. EINLEITUNG

Die Aminosäure Tryptophan spielt im Stoffwechsel der Insekten eine bedeutende Rolle. Wie CHEFURKA (1965) beschreibt, ist Tryptophan auch für Insekten eine essentielle Aminosäure, die mit der Nahrung aufgenommen werden muß. Im Gegensatz zu anderen Aminosäuren liegt sie in der Hämolymphe der Insekten nur in geringen Konzentrationen vor (Zusammenfassung: GILMOUR, 1961). Das Tryptophan hat im Stoffwechsel der Insekten zwei entscheidende Funktionen:

1. Als Aminosäure ist es Baustein von Proteinen. Mit ca. 1 % ist sein Anteil am Proteinaufbau jedoch sehr gering (SCHARTAU, 1970; LINZEN, 1973).
2. Aus Tryptophan entstehen Stoffe, die für die Physiologie und den Phänotypus der Insekten von Bedeutung sind. Unter anderem gehen aus ihm die Ommochrome hervor. Diese gelblich-braunen bis dunkelvioletten Pigmente sind nicht nur bei Insekten, sondern auch bei anderen Tiergruppen weit verbreitet (Zusammenfassungen bei BUTENANDT, 1957; LINZEN, 1967; 1973). Andere Metabolite des Tryptophans werden als sogenannte "metabolische Exkrete" in den Flügelschuppen von Schmetterlingen abgelagert und bestimmen durch ihre Eigenfärbung mit den Phänotypus dieser Arten (BROWN, 1965; BROWN und BECHER, 1967; UMEBACHI und YOSHIDA, 1970). Ganz allgemein haben die Organismen es verstanden, aus dem Tryptophan Stoffe herzustellen, die in ihrem Stoffwechsel spezifische Funktionen ausüben. So ist zum Beispiel das Pflanzenwuchshormon, die Indolelessigsäure, ein Abkömmling des Tryptophans, ferner das Coenzym NAD, das Hormon Melatonin und die Transmittersubstanz

Serotonin.

Angeichts der zweifachen Rolle des Tryptophans im Stoffwechsel der Insekten könnte eine Regulation seines Abbaues von Bedeutung sein. Hinweise darauf ergeben sich aus dem Verlauf der Metabolitkonzentrationen während der Entwicklung: Während der Metamorphose beobachtet man häufig ein vermehrtes Auftreten fluoreszierender Tryptophanmetabolite; auch die Ommochrome entstehen ganz überwiegend während der Imaginalentwicklung (Zusammenfassungen bei ZIEGLER, 1961; LINZEN, 1973). Ein vollständiger Abbau des Tryptophans zu CO_2 , NH_3 und H_2O über den Glutaratweg (Zusammenfassung bei HENDERSON, GHOLSON und DALGLIESH, 1962) findet nicht statt (LAN und GHOLSON, 1965; SCHARTAU und LINZEN, 1969).

Das erste Enzym, das in die Abbaukette des Tryptophans eingreift und damit regulatorische Funktionen im Tryptophanabbau ausüben kann, ist die Tryptophanoxygenase (E.C. 1.99.2.c; Abb. 1).

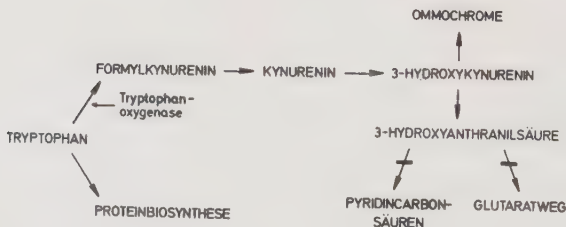


Abb. 1: Funktionen des Tryptophans im Stoffwechsel der Insekten.

Sie spaltet oxydativ den Indolring des Tryptophans (Abb. 2).

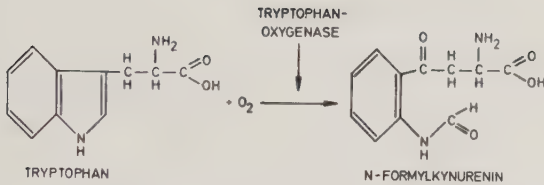


Abb. 2: Schema der Tryptophanspaltung.

Über die Charakterisierung der Tryptophanoxygenase bei Säugern und Bakterien liegen eine Vielzahl von Arbeiten vor. Es gelang hauptsächlich den Arbeitsgruppen um KNOX, FEIGELSON und HAYAISHI Aufschluß über Eigenschaften und Reaktionsmechanismus des Enzyms zu erhalten. Die Oxygenase wurde 300- bis 1000-fach aus Rattenlebern (FEIGELSON und GREENGARD, 1961; GREENGARD und FEIGELSON, 1962) und 800-fach aus *Pseudomonas* angereichert (POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON, 1969). Für das Rattenleber- und Bakterienenzym wurde ein Molekulargewicht von 103000 (TOKUYAMA, 1968), für das Bakterienenzym ein Molekulargewicht von 121000 ermittelt (POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON, 1969). Durch alkalische Pufferlösungen, Behandlung mit Guanidinchlorid oder Natriumdodecylsulfat wurden 4 identische, inaktive Untereinheiten mit Molgewichten von 28000 bis 35000 erhalten (POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON, 1969). Als Co-faktor der Tryptophanoxygenase wurde Hämatin wahrscheinlich ge-

macht (GREENGARD und FEIGELSON, 1962; GREENGARD, 1964; FEIGELSON, ISHIMURA und HAYAISHI, 1965). In neuester Zeit konnte nachgewiesen werden, daß auch Kupfer als Cofaktor für die Oxygenase fungiert (BRADY, MONACO, FORMAN, SCHUTZ und FEIGELSON, 1972; BRADY, FEIGELSON und RAJAGOPALAN, 1973).

In Insekten gelang der Nachweis der Tryptophanoxygenase erstmals EGELHAAF (1958) bei *Ephestia* und BAGLIONI (1959; 1960) bei *Drosophila*. KAUFMAN (1962), MARZLUF (1965a) und BAILLIE und CHOVIK (1971) bemühten sich um eine Anreicherung der Oxygenase aus *Drosophila* und bestimmten einige Charakteristika des Enzyms. Über die Lokalisation der Tryptophanoxygenase in bestimmten Geweben (bei Säugetieren ist sie auf die Leber beschränkt) liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: RIZKI und RIZKI (1963) und RIZKI (1964) finden bei *Drosophila* nur im Fettkörper Oxygenaseaktivität. PINAMONTI und PETRIS (1966) und PINAMONTI, PETRIS und COLOMBO (1966) bestätigen diesen Befund für *Schistocerca*. KAUFMAN (1962) dagegen weist auch in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila* Tryptophanoxygenaseaktivität nach. EGELHAAF (1963) findet bei *Ephestia* den Hauptteil der Oxygenaseaktivität im Fettkörper, geringere Aktivität aber auch in den Gonaden, den Spinndrüsen, dem Darm und der Epidermis. LINZEN (1971) weist bei *Bombyx* in den unterschiedlichsten Geweben Enzymaktivität nach, TIEDT (1971) bestätigt das gewebeunspezifische Auftreten des Enzyms auch für *Gryllus*. Nur wenige Daten liegen über Versuche zur Anreicherung der Tryptophanoxygenase aus Insekten vor: EGELHAAF (1963) reinigt das Enzym 3,2-fach aus *Ephestia*, MARZLUF (1965a) gelingt eine 17-fache Anreicherung aus *Drosophila*, BAILLIE und CHOVIK (1971) erreichen

eine ca. 60-fache Anreicherung aus *Drosophila* und NAWA (1970) gewinnt das Enzym in einer 80-fach gereinigten Präparation aus *Ephestia*.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Tryptophanoxygenase aus der Schmeißfliege *Phormia terraenovae* anzureichern und zu charakterisieren. Die Untersuchung dieses Enzyms geschieht unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Wie erwähnt, ist es das erste Enzym des Tryptophanabbaues und könnte somit der Angriffspunkt für dessen Regulation sein. In den Arbeiten, die sich mit der Tryptophanoxygenase bei Insekten beschäftigen, liegen über regulatorische Eigenschaften des Enzyms nur spärliche Hinweise vor.
2. Während der Metamorphose der Insekten ist ein spezifischer, stadienabhängiger Verlauf der Tryptophanoxygenaseaktivität zu erwarten. Durch Versuche von EGELHAAF (1963), KAUFMAN (1962), PINAMONTI und PETRIS (1966) und PINAMONTI, PETRIS und COLOMBO (1966) wird gezeigt, daß die Aktivität der Tryptophanoxygenase bei verschiedenen Tiergruppen in larvalen und imaginalen Geweben unterschiedlich hoch ist. TIEDT (1971) untersucht den Verlauf der Oxygenaseaktivität im Fettkörper des letzten Larvenstadiums von *Gryllus* und LINZEN (1971) weist nach, daß bei *Bombyx* unterschiedliche Gewebe unterschiedliche Enzymaktivitätsverläufe während der Imaginalentwicklung aufweisen. Untersuchungen über den gesamten Entwicklungszyklus eines Insekts fehlen aber. Andererseits könnte man, da Tryptophan in bestimmten Organen von Insekten gespeichert werden kann (WESSING und BONSE, 1962) eine organspezifische Verteilung der Tryptophanoxy-

genase durchaus erwarten.

3. Es ist bisher ungeklärt, ob die Aktivitätsschwankungen während der Entwicklung auf eine unterschiedliche Hemmung oder Aktivierung vorhandenen Enzyms, oder ob sie auf Schwankungen der Apoenzymkonzentration zurückgehen. Mit einer hoch angereicherten Enzympräparation ließen sich Antikörper für die Oxygenase herstellen, mit deren Hilfe der Nachweis gelänge, ob unterschiedliche Enzymaktivitäten während der Entwicklung der Insekten tatsächlich auf unterschiedliche Mengen des Enzymproteins zurückzuführen sind.

4. Von allgemeinem Interesse ist der Vergleich des Insektenenzyms mit dem Säugerenzym. Bedingt durch die Imaginalentwicklung der Insekten ist anzunehmen, daß die Tryptophanoxygenase dieser Tiergruppe in Bezug auf Substrat- und Sauerstoffaffinität, Stabilität, Cofaktor und andere physiko-chemische Eigenschaften Unterschiede zum Säuger- und Bakterienenzym aufweist. Anhaltspunkte dazu ergeben sich aus den Arbeiten von MARZLUF (1965a), TARTOF (1969), LANCASTER und SOURKES (1969) und BAILLIE und CHOVIK (1971).

Bei der vorliegenden Arbeit galt es zunächst, einen Routine-test für die Oxygenasebestimmung und eine reproduzierbare Standardaufarbeitung zur Gewinnung hochgereinigter Tryptophanoxygenasepräparationen aus *Phormia terraenovae* auszuarbeiten. Mangels geeigneter Anhaltspunkte mußte zunächst eine große Zahl von Vorversuchen ausgeführt werden, um geeignete Bedingungen für die Behandlung des Enzyms zu finden.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Tiere

1) *Phormia terraenovae* ROB.-DESV.

Diese Art wird seit mehreren Jahren als Inzuchtstamm am Institut gehalten. Die Aufzucht der Larven erfolgte aus Pferdefleisch in mit feuchtem Sägemehl gefüllten Gläsern im Brutschrank bei 30°C. Die Imagines erhielten Zucker und Hefe als Nahrung, sowie Trinkwasser nach Belieben.

2) *Calliphora erythrocephala* MEIG., Wildstamm

Dieser Stamm wird ebenfalls seit mehreren Jahren als Inzuchtstamm am Institut gehalten. Die Aufzucht der Larven erfolgte analog zu *Phormia*, die Aufzuchttemperatur betrug 20°C.

II. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von pA-Qualität. Sie wurden von MERCK bezogen, mit Ausnahme von:

Methämoglobin	SIGMA, St. Louis, USA
α -Methyl-Tryptophan	
D-Tryptophan	
Ribonuklease A	
Serumalbumin	
Hämatin	CALBIOCHEM, Los Angeles, USA
Häminchlorid	
Hämatoporphyrin-	
dihydrochlorid	
Streptomycinsulfat	SCHUCHARDT, München
Protaminsulfat	
DEAE-Zellulose	SERVA, Heidelberg
Typen SH, SS, SN	
TEAE-Zellulose	
AE-Zellulose	
Sephadex G-150; G-200	PHARMACIA, Uppsala, Schweden
DEAE-Sephadex	

Eichproteine für die
Molekulargewichts-
bestimmung

BOEHRINGER, Mannheim

Ampholine für die
Elektrofocussierung

LKB-PRODUKTER, Bromma, Schweden

Kynureninformamidase wurde in Anlehnung an SHINOHARA und ISHIGURO (1970) in Form einer ca. 11-fach angereicherten Präparation aus Rattenlebern gewonnen. Das Enzym konnte bei 4°C 12 Monate ohne signifikante Aktivitätsverluste aufbewahrt werden. Die spezifische Aktivität betrug 0,4 U/mg Protein, die Lösung wurde unverdünnt für die Tryptophanoxygenasetests eingesetzt. Die Formamidasepräparation enthielt noch sehr geringe Tryptophanoxygenaseaktivität, die von den in den Versuchen erhaltenen Aktivitäten abgezogen werden mußte.

III. Präparation der Organe

Die Tiere wurden unter Ringerlösung nach STEVENSON und WYATT (1962) aufpräpariert. Bei L a r v e n wurden Malpighische Gefäße, Darm, Fettkörper und Hautmuskelschlauch, bei I m a - g i n e s Malpighische Gefäße, Darm, Fettkörper, Ovarien beziehungsweise Hoden, Flugmuskulatur und Augen isoliert. Bei P u p p e n wurde auf eine Präparation verzichtet, da isolierbare Gewebe erst gegen Ende der Puppenruhe ausdifferenzieren. Die einzelnen Gewebe wurden in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer, pH 8,2 homogenisiert und die Homogenate im Standardtest auf Oxygenaseaktivität untersucht.

IV. Inkubation für die Bestimmung der Aktivität der Tryptophanoxygenase

Für die Inkubationen wurde zunächst in Anlehnung an PINAMONTI und PETRIS (1966) folgendes Medium benutzt:

0,1 ml Enzympräparation, 0,5 ml 20 mM Tryptophan in Wasser, 0,5 ml 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,25, 0,1 ml 2 mM Ascorbinsäure in Wasser und 0,05 ml Formamidasepräparation wurden 2 Stunden in einem Eppendorfggefäß bei 37°C inkubiert und die Enzymreaktion durch 0,1 ml 50%ige Trichloressigsäure abgestoppt. Später wurde auf Grund der Angaben von MARZLUF (1965a), BAILLIE und CHOVIK (1971) und der eigenen Versuche (siehe C III) das Medium folgendermaßen modifiziert: In einem Eppendorfggefäß wurden 0,1 ml der Enzympräparation, 1,0 ml 10 mM Tryptophan in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,25, 0,1 ml 1,5 mM Mercaptoäthanol in Puffer und 0,1 ml (150 µg) Methämoglobin zusammen inkubiert und die Reaktion nach 2 Stunden durch Zugabe von 0,1 ml 50%ige Trichloressigsäure abgestoppt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 7 bis 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die vollständige Hydrolyse des Formylkynurenins zu gewährleisten. Für jeden Enzymtest wurden Doppelbestimmungen angesetzt.

V. Bestimmung des gebildeten Kynurenins

Das gebildete Kynurenin wurde nach der Methode von BRATTON und MARSHALL (1939) bestimmt. Zu 1 ml des abzentrifugierten Inkubationsansatzes wurden 0,1 ml 0,1%iges Natriumnitrit, nach 3 Minuten 0,1 ml 0,5%iges Ammoniumsulfaminat und nach weiteren 2 Minuten 0,1 ml 0,1%iges BRATTON-MARSHALL-Reagens pipettiert und jeweils gründlich vermischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert (siehe C I). Durch Zugabe von 1 ml n-Propanol konnten bei der Reaktion auftretende Konzentrationsniederschläge, welche die photometrische Bestimmung des Farbkomplexes empfindlich stör-

ten, in Lösung gebracht werden. Kynurenin-Standardlösungen wurden photometrisch überprüft, Protein wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

VI. Gewinnung der Tryptophanoxygenase aus *Phormia terraenovae*

Larven, Puppen und Imagines wurden in 0,14 M KCl + 2,5 mM NaOH (KNOX, 1950) homogenisiert, wobei 0,5 % einer gesättigten Phenylthioharnstofflösung zur Hemmung der Tyrosinaseaktivität und 20 mg Aktivkohle/ml Medium (BAILLIE und CHOVIK, 1971) zugesetzt wurden. Homogenisation mit Aktivkohle bewirkt eine 2-fach höhere Tryptophanoxygenaseaktivität im Rohhomogenat.

VII. Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung der Tryptophanoxygenase durch Gelfiltration

Das zu trennende Proteingemisch wurde auf Glassäulen (2,5 mal 120 cm), gefüllt mit bei 95°C gequollenem Sephadex Gel G-150, welches über Nacht mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert worden war, aufgetragen. Anschließend wurde mit dem gleichen Puffer eluiert, der Proteingehalt im Durchflußphotometer registriert und die Oxygenaseaktivität der Fraktionen (Volumen ca. 8 ml) ermittelt. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde die Säule mit Eichproteinen (Standardsatz der Firma Boehringer) jeweils vor und nach dem Lauf der Oxygenasepräparation geeicht und das Molekulargewicht mit Hilfe der erhaltenen Eichgeraden (Abszisse: Logarithmus des Molekulargewichtes; Ordinate: Elutionsvolumen von der Säule) bestimmt.

VIII. Chromatographie der Tryptophanoxygenase über DEAE-Zellulose

Zellulosen verschiedener Kapazitäten wurden nacheinander mit

0,5 N NaOH (30 Min.), 0,1 M HCl (10 Min.) und 0,1 M NaOH (30 Min.) gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde mit Wasser alkali- beziehungsweise säurefrei gewaschen. Vorversuche hatten gezeigt, daß ungewaschene Zellulose keine reproduzierbaren Trennungen erlaubt. Die so vorbehandelte Zellulose wurde in Säulen gefüllt (1,5 mal 30 cm) und über Nacht mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert. Anschließend wurde das zu trennende Proteingemisch aufgetragen und mit einem Stufengradienten (0,01, 0,05, 0,15 und 0,2 M Phosphatpuffer pH 8,0) oder einem linearen Gradienten (0,01 - 0,2 M Phosphatpuffer pH 8,0) eluiert. Der Proteingehalt des Eluats wurde im Durchflußphotometer registriert und die einzelnen Fraktionen (Volumen ca. 5 ml) auf Oxygenaseaktivität untersucht.

IX. Isoelektrofocussierung

Für diese Versuche wurde jeweils Protein einer Sephadex-Gelfiltration verwendet. Sie wurden in der 110 ml Säule der Firma LKB durchgeführt. Zusammensetzung und Konzentration der erforderlichen Lösungen entsprachen den Angaben in der Bedienungsanleitung. Die Focussierung (Anode unten) erfolgte in einem Sucrose-Dichtegradienten mit 2 %iger Ampholinelösung in einem pH-Bereich von 3 - 10 und von 3 - 6. Die Versuche dauerten bei einer Temperatur von 5°C ungefähr 36 Stunden, dann begann das Protein in der Säule auszuflocken. Die Säule wurde über einen Fraktionssammelbehälter in Proben zu ca. 2 ml entleert und pH und Oxygenaseaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt.

X. Bestimmung der Michaelis-Konstanten für Sauerstoff

Für diese Versuche wurde folgende Apparatur benützt (Abb. 3):

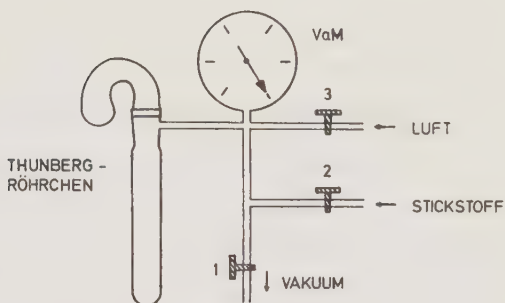


Abb. 3: Versuchsapparatur zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten für Sauerstoff.

In je ein Thunbergröhrchen (Inhalt Hauptgefäß: 5 ml; Inhalt Seitenarm: 2 ml) wurden pipettiert:

- a. Hauptgefäß: 1,2 ml des Inkubationsmediums (siehe Seite 9)
- b. Seitenarm: 0,1 ml einer vorgereinigten Enzympräparation.

Über Hahn 1 wurden die Thunbergröhrchen evakuiert und durch Hahn 2 mit Stickstoff gespült. Dieser Vorgang wurde 10-mal wiederholt, wobei sich die Flüssigkeiten jeweils ca. 10 Min. mit dem eingespülten Stickstoff äquilibrieren konnten. Damit war sichergestellt, daß in der Apparatur und den Lösungen kein Sauerstoff mehr vorhanden war. Anschließend wurde wieder evakuiert und durch Hahn 3 in Schritten zu 0,1 atm (zu registrieren mit dem Vakuummeter VaM) Luft eingelassen. Die Differenz zum herrschenden Luftdruck wurde mit Stickstoff auf-

gefüllt. Die Reaktion wurde durch Vereinigung der Lösungen in Hauptgefäß und Seitenarm gestartet und durch rasches Öffnen der Gefäße und Einpipettieren von 0,1 ml 50 %iger Trichlor-essigsäure gestoppt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Tryptophanoxygenase bei normalem Luftdruck bereits mit Sauerstoff gesättigt ist und durch reinen Sauerstoff in ihrer Aktivität gehemmt wird. Daher wurde mit Sauerstoffkonzentrationen unterhalb seiner Konzentration in Luft gearbeitet. Der Partialdruck des Sauerstoffes in der Reaktionslösung errechnet sich aus der eingeströmten Luftmenge, dem Gesamtvolumen der Versuchsanordnung, dem Barometerdruck und dem Bunsenschen Absorptionskoeffizienten.

C. E R G E B N I S S E

I. VORVERSUCHE

Aus den Arbeiten, die sich mit der Tryptophanoxygenasereaktion bei Insekten beschäftigen, lagen zum Teil sehr unterschiedliche Daten zur Charakterisierung der Enzymreaktion vor. Daher mußten optimale Inkubations- und Meßbedingungen zur Bestimmung der Tryptophanoxygenaseaktivität aus *Phormia terrae-novae* ausgearbeitet werden.

1. Standardisierung der BRATTON-MARSHALL-Reaktion

Die Tryptophanoxygenaseaktivität wird meistens - besonders beim Vorliegen sehr geringer Aktivitäten - durch Messung des gebildeten Kynurenins nach der Methode von BRATTON und MARSHALL (1939) bestimmt. Während BRATTON und MARSHALL den dabei ent-

stehenden roten Farbstoff sofort nach Vermischen der Reagentien messen, geben verschiedene Autoren andere Meßzeiten an (PINAMONTI und PETRIS, 1966: 30 Min.; MARZLUF, 1965a: 50 Min.; TARTOF, 1969: 120 Min. bei $24,5^{\circ}\text{C}$). Daher wurde die Kinetik der BRATTON-MARSHALL-Reaktion bei Zimmertemperatur und bei 37°C verglichen (Abb. 4).

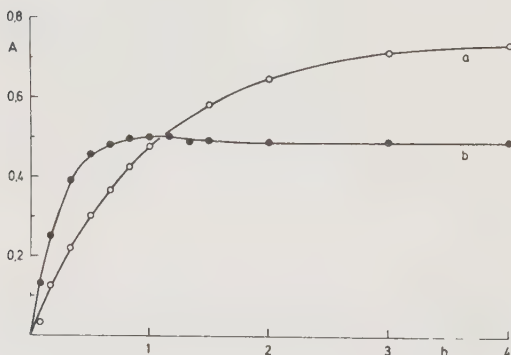


Abb. 4: Kinetik der BRATTON-MARSHALL-Reaktion bei Zimmertemperatur (a) und bei 37°C (b).

Bei Zimmertemperatur wird die Maximaextinktion erst nach 3 - 4 Stunden erreicht. Im ansteigenden Ast der Kurve macht ein Meßzeitunterschied von 10 Min. bereits einen Extinktionsunterschied von 0,05 - 0,1 Einheiten aus. Dadurch werden unterschiedliche Enzymaktivitäten vorgetäuscht. Bei 37°C ist der rote Farbstoff bereit nach 1 Stunde voll ausgebildet. Die Absolutwerte liegen zwar um ca. 20% niedriger als bei Zimmertemperatur, die Methode liefert jedoch sehr genau reproduzierbare Werte.

Die BRATTON-MARSHALL-Reaktion wird nach MARZLUF (1965a) durch Ascorbinsäure beeinflusst. Er verwendet daher als Reduktionsmittel Mercaptoäthanol und erreicht damit auch eine höhere Aktivierung der Oxygenase aus Insekten. Der Einfluß von Ascorbinsäure und Mercaptoäthanol auf die BRATTON-MARSHALL-Reaktion wurde untersucht (Abb. 5).

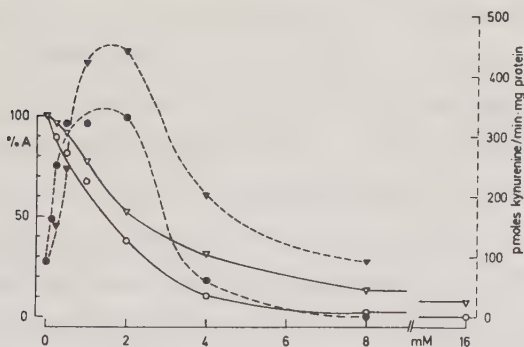


Abb. 5: Abhängigkeit der BRATTON-MARSHALL-Reaktion von unterschiedlichen Ascorbinsäure- (O) und Mercaptoäthanolkonzentrationen (▽), angegeben in % der Extinktion ohne Reduktionsmittel, sowie Aktivierung der Tryptophanoxygenase durch unterschiedliche Ascorbinsäure- (●) und Mercaptoäthanolkonzentrationen (▼).

Mit 2 mM Ascorbinsäure, der Konzentration der maximalen Enzymaktivierung, werden nur 38% der Maximaextinktion der BRATTON-MARSHALL-Reaktion erreicht. Das bedeutet, daß auch nur 38% der tatsächlichen Tryptophanoxygenaseaktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu werden mit 2 mM Mercaptoäthanol aber 52% der Maximaextinktion und damit auch 52% der Enzymaktivität gemessen. Daher werden also nur scheinbar unter-

schiedliche Enzymaktivitäten erhalten: Bezogen auf 100% Extinktion ist die Aktivierung der Tryptophanoxygenase durch Ascorbinsäure und Mercaptoäthanol gleich hoch!

2. Nachweis der Insektenoxygenase in den löslichen Fraktionen

Die Tryptophanoxygenase ist bei Säugetieren in den löslichen Fraktionen von Leberhomogenaten lokalisiert (KNOX, 1950).

Diese cytoplasmatische Lokalisation war bei den Fliegen zunächst zu überprüfen, zumal andere Autoren ein Vorkommen in anderen Zellfraktionen nicht ausdrücklich ausgeschlossen hatten. 50 Imagines, ca. 10 Tage alt, wurden im Medium nach KNOX (1950) homogenisiert und abzentrifugiert. Der Homogenatrückstand wurde im Medium resuspendiert und noch dreimal extrahiert. Die Überstände und der resuspendierte Rückstand wurden auf Tryptophanoxygenaseaktivität untersucht. Tabelle 1 zeigt, daß nur im Homogenatüberstand I nennenswerte Oxygenaseaktivität auftritt; wiederholtes Extrahieren setzt keine weitere Aktivität frei. Ebenso ist der im Medium resuspendierte Rückstand frei von Oxygenaseaktivität.

Tabelle 1: Nachweis der Tryptophanoxygenase in den löslichen Fraktionen von Fliegenimagines. Angegeben sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein.

Versuch	1	2	3
Überstand I	254	162	197
Überstand II	10	4	3
Überstand III	0	0	0
Überstand IV	0	0	0
Rückstand	0	0	0

Der Einwand, daß die gemessene Enzymaktivität nicht auf Eigenaktivität der Tiere, sondern, da nicht steril gearbeitet wurde, auf Bakterien der Darmflora zurückzuführen sei, konnte entkräftet werden:

a) 20 Imagines, ca. 10 Tage alt, wurden homogenisiert und die Enzymaktivität bestimmt.

b) Von 20 Imagines gleichen Alters und gleicher Aufzucht wie (a) wurde der Darm herauspräpariert und getrennt vom Restkörper auf Oxygenaseaktivität untersucht.

c) Von weiteren 20 Imagines wurde der Darm herauspräpariert, mit Ringerlösung ausgewaschen und Restkörper, Darmwand und Waschflüssigkeit auf Enzymaktivität untersucht.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist der Hauptteil der Tryptophanoxygenaseaktivität (90 - 95%) im Restkörper, der übrige Teil in der Darmwand (5 - 10%) und keine Aktivität im Darminhalt zu finden.

Tabelle 2: Vergleich der Aktivität der Tryptophanoxygenase in Darm, Darmwand, Darminhalt und Totalhomogenaten von Fliegenimagines. Die Werte sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein.

Versuch	1	2	3	4
Restkörper	280	182	220	325
Darm	30	17	-	-
Darmwand	-	-	12	26
Darminhalt	-	-	0	0
Gesamthomogenat	323	196	240	344

Die Tryptophanoxygenaseaktivität, die in den Versuchen gemessen wird, ist also auf Eigenaktivität der Tiere zurückzuführen.

3. Linearität der Enzymreaktion mit der Zeit und mit der Proteinkonzentration

Die Linearität der Reaktion wurde zunächst mit einem Homogenatüberstand geprüft. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, setzt die Enzymreaktion erst nach einer lag-Phase von 30 Min. ein, bleibt dann aber mindestens während 2 1/2 Stunden linear.

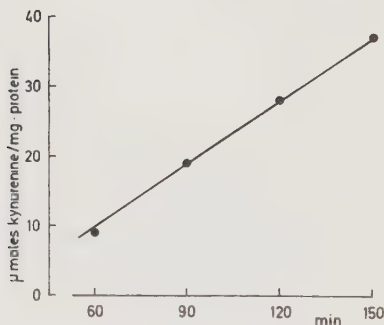


Abb. 6: Linearität der Oxygenasereaktion mit der Zeit.

Eine zweistündige Inkubation bei allen Versuchen erwies sich als vorteilhaft; die Werte der Doppelbestimmungen schwankten nur gering (0,001 - 0,005 Extinktionseinheiten). Auf die lag-Phase wird weiter unten eingegangen.

Die Linearität der Enzymreaktion mit der Proteinkonzentration wurde mit Rohextrakt und 60%-Ammonsulfatniederschlag, gelöst in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer untersucht. Die Proteinlösungen wurden in 1 : 1 Schritten verdünnt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Tryptophanoxygenase linear mit der Proteinkonzentration an.

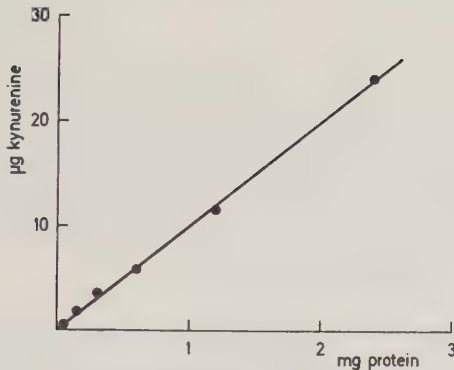


Abb. 7: Linearität der Oxygenasereaktion mit der Proteinkonzentration.

4. Stabilität der Tryptophanoxygenase

a. Stabilität des Enzyms in L ö s u n g e n

Für diese Versuche wurde Rohhomogenat von Fliegenimagines zu 60% mit festem Ammoniumsulfat versetzt und das ausgefällte Protein, welches eine ca. 3-fach angereicherte Form der Oxygenase darstellt, eingesetzt. Diese Präparation, ab jetzt kurz als AS-Niederschlag bezeichnet, ist die Ausgangsbasis für fast alle weiteren Versuche.

aa. Stabilität in Lösungen konstanter Ionenstärke und unterschiedlichen pHs

AS-Niederschlag wurde in 0,1 M Natriumcitrat-Citronensäurepuffer, pH 3,0 bis 5,0, in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0 bis 8,0 und in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer, pH 9,0 und 10,0 gelöst, mehrere Tage im Kältelabor aufbewahrt und jeden Tag auf Oxygenase-

aktivität untersucht. Für die Inkubation wurde pH 8,25 eingestellt. Zum Vergleich wurde täglich Protein der gleichen Ammonsulfatfällung in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,25 frisch gelöst und ebenfalls getestet. Da sich in Puffern von pH 6,0 oder saurer das Enzym nur unvollständig löste und auch das gelöste Protein teilweise denaturierte, wurden diese Lösungen vor jeder Aktivitätsbestimmung abzentrifugiert und nur der klare Überstand für den Test verwendet.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, bleibt die Aktivität der Oxygenase bei allen pH-Werten über einen Zeitraum von 3 Tagen konstant; erst danach ist mit höheren Aktivitätsverlusten zu rechnen (bis zu 50% bezogen auf das täglich neu in TRIS-HCl-Puffer gelöste Vergleichsprotein).

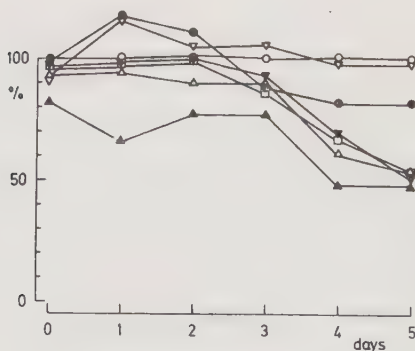


Abb. 8: Stabilität der Tryptophanoxxygenase in Puffern konstanter Ionenstärke und unterschiedlichen pHs in % bezogen auf das täglich frisch in TRIS-HCl-Puffer pH 8,25 gelöste Protein. ▲ = pH 5; ● = pH 6; △ = pH 7; ▽ = pH 8; ▼ = pH 9; ◻ = pH 10.

aaa. Stabilität in Lösungen konstanten pHs und unterschiedlicher Ionenstärke

AS-Niederschlag wurde in 0,005 M bis 0,5 M Phosphatpuffer pH 8,0 gelöst und mehrere Tage im Kältelabor aufbewahrt. Jeden Tag wurde eine Aktivitätsbestimmung gemacht und zum Vergleich frisch in TRIS-HCl-Puffer gelöstes Protein herangezogen (Abb. 9).

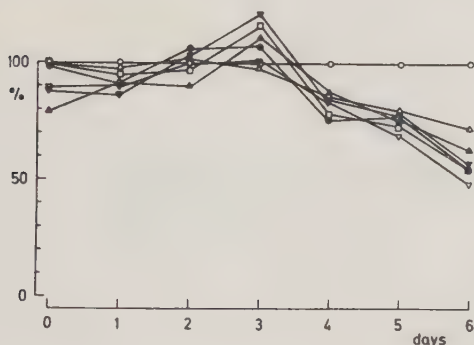


Abb. 9: Stabilität der Tryptophanoxxygenase in 0,005 M bis 0,5 M Phosphatpuffer pH 8,0 in % bezogen auf das täglich frisch in TRIS-HCl-Puffer pH 8,25 gelöste Protein.
 ▽ = 0,005 M; ▼ = 0,01 M; ● = 0,05 M; △ = 0,1 M; ▲ = 0,25 M;
 □ = 0,5 M.

Die Stabilität der Tryptophanoxxygenase wird von der Ionenstärke nicht beeinflußt. Während 3 Tagen bleibt die Aktivität in allen Lösungen konstant und sinkt erst danach - möglicherweise durch bakterielle Kontamination - auf ca. 50% der Vergleichsaktivität ab. Zieht man die unter (aa) geschilderten Ergebnisse heran, ist also die Behauptung gerechtfertigt, daß die Tryptophanoxxygenase aus *Phormia* in Lösung ein relativ stabiles Enzym ist.

b. Stabilität des Enzyms als Ammonsulfatniederschlag

AS-Niederschlag wurde in der Ammonsulfatlösung im Kältelabor aufbewahrt und sporadisch auf Aktivität untersucht. Wie in Abb. 10 gezeigt wird, ist der Ammonsulfatniederschlag eine sehr stabile Präparation der Insektenoxygenase. Selbst nach 15 Tagen hat die Aktivität des Enzyms nur geringfügig abgenommen.

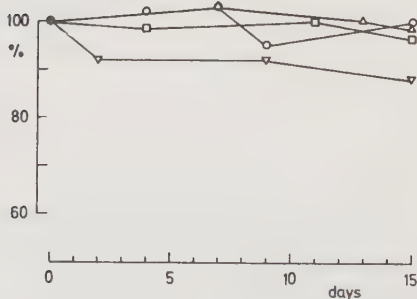


Abb. 10: Stabilität der Tryptophanoxygenase als Ammonsulfatniederschlag in % bezogen auf die Ausgangsaktivität.

c. Acetontrockenpulverpräparationen

Fliegenimagines (ca. 10 Tage alt) wurden nach MORTON (1955) in eiskaltem, wasserfreiem Aceton homogenisiert, das Homogenat abgenutscht und dreimal mit eiskaltem Aceton nachgewaschen. Das Acetontrockenpulver wurde im Exsiccator über P_2O_5 und NaOH-Plättchen getrocknet und sporadisch auf Oxygenaseaktivität

untersucht. Nach 5 Monaten ist die Aktivität bei 2 Präparationen auf 30% des Ausgangswertes abgesunken, eine Präparation zeigt schon nach 1 1/2 Monaten keine Oxygenaseaktivität mehr (Abb. 11). Der relativ rasche Aktivitätsverlust dieser Präparation ist durch Feuchtwerden der Aufarbeitung zu erklären. Der Vergleich dieser Präparationen mit dem Verhalten des Ammonsulfatniederschlags führt jedoch einwandfrei zur Bevorzugung des letzteren als Aufbewahrungsform.

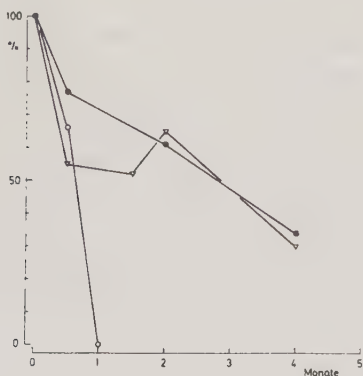


Abb. 11: Stabilität der Tryptophanoxigenase als Acetontrockenpulver-Präparation in % bezogen auf die Ausgangsaktivität.

Die weiteren Eigenschaften des Enzyms, insbesondere Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von pH, Substratkonzentration und zugesetztem Cofaktor werden unten ausführlich besprochen. Aus ihnen wurde ein optimales Inkubationsmedium entwickelt, welches bei allen Anreicherungs-schritten zur Kontrolle der Enzymaktivitäten verwendet wurde.

II. ANREICHERUNGSVERSUCHE

Wie bereits weiter oben erwähnt (S. 6), liegen nur wenige Daten zur Anreicherung der Tryptophanoxygenase aus Insekten vor. Daher wurden verschiedene Methoden erprobt, um möglichst hoch angereicherte Enzympräparationen zu gewinnen. Alle Versuche wurden bei 4 - 5°C durchgeführt.

1. Protaminsulfatfällung

Rohhomogenat ca. 10 Tage alter Fliegen wurde nach MARZLUF (1965a) zu 8% des Volumens tropfenweise und unter Rühren mit einer gesättigten Protaminsulfatlösung versetzt. Die Lösung wurde weitere 30 Min. gerührt und anschließend mit 34000 g abzentrifugiert. Es resultierten ein klarer Überstand und ein in Wasser und Puffer unlösbarer Niederschlag. Durch die Protaminsulfatbehandlung wird zwar keine wesentliche Anreicherung der Oxygenase erreicht, es werden aber Nukleinsäuren ausgefällt (Abb. 12).

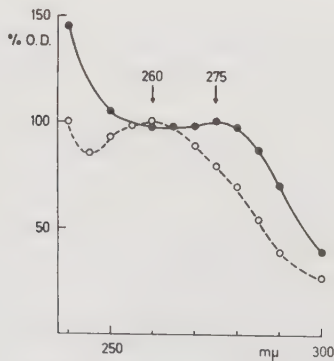


Abb. 12: Vergleich der UV-Spektren von 60%-Ammonsulfatfällungen in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0, mit (●) und ohne (○) vorherige Behandlung des Rohhomogenates durch Protaminsulfat. Der Gipfel bei 260 nm, bedingt durch Nukleinsäuren, verschwindet zugunsten des Proteingipfels bei 275 nm.

Dies ist von Vorteil, weil das im nächsten Schritt durch Ammonsulfat ausgefällte Protein sich im Gegensatz zu nicht vorbehandelten Extrakten klar in Wasser und Puffer löst.

2. Ammonsulfatfällung

Der klare Überstand einer Protaminsulfatfällung wurde mit festem Ammonsulfat zu verschiedenen Konzentrationen gesättigt und Überstände und Niederschläge untersucht. Zwischen 45% und 60% Ammonsulfatsättigung wird eine ca. 3-fach angereicherte Oxygenasepräparation erhalten. Dieser Wert stimmt mit Ergebnissen von EGELHAAF (1963; ca. 3,2-fache Anreicherung des Enzyms aus *Ephesia* bei 50 - 75% Ammonsulfatsättigung) und MARZLUF (1965a; ca. 3-fache Anreicherung aus *Drosophila* bei 45 - 60% Ammonsulfatsättigung) überein.

3. Anaerobe Hitzedenaturierung

POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON (1969) und ISHIMURA et al. (1970) erreichten durch anaerobe Hitzedenaturierung von Rohextrakten und Ammonsulfatfällungen bis zu 40-fach angereicherte Präparationen der Tryptophanoxygenase aus *Pseudomonas*. In eigenen Experimenten wurden die Versuchsbedingungen etwas verändert: AS-Niederschlag wurde in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,2 gelöst. Dem Ansatz wurden 10% des Volumens einer bei Zimmertemperatur gesättigten Tryptophanlösung sowie 0,5% Mercaptoäthanol zugefügt und die Lösung 30 Min. bei Zimmertemperatur

gerührt. Unter weiterem Rühren wurde 15 Min. lang Stickstoff durch die Lösung geperlt und das Reaktionsgemisch bei anhaltendem Stickstoffstrom 10 Min. im Wasserbad auf 57°C erhitzt. Nun wurde die Lösung sofort im Eisbad auf ca. 5°C abgekühlt und das denaturierte Protein abzentrifugiert. Es resultiert eine klare Lösung, in der die Oxygenase ca. 3-fach angereichert ist.

4. Gelfiltration

Filtration über Sephadex G-200 erwies sich wegen der langsamen Laufgeschwindigkeit und damit verbundener hoher Aktivitätsverluste (50 - 60%, bezogen auf die aufgetragene Gesamtaktivität) als ungeeignet, obwohl das Enzym in relativ wenigen Fraktionen wiedergefunden wurde. Bezogen auf den AS-Niederschlag erhielt man eine ca. 3-fach angereicherte Enzympräparation. Dagegen bietet Sephadex G-150 die Möglichkeit, weiteres inaktives Protein in relativ kurzer Zeit abzutrennen (Abb. 13).

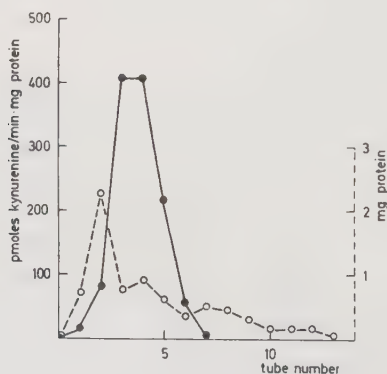


Abb. 13: Elutionsdiagramm eines AS-Niederschlages über Sephadex G-150. Elutionspuffer: 0,1 M Phosphat, pH 8,0; Laufzeit: 6 Stunden; Probenvolumen: 7 ml.

Die Tryptophanoxygenase findet sich im absteigenden Ast des ersten Proteingipfels; sie verteilt sich über mehrere Fraktionen. Das Enzym wird ca. 3-fach angereichert, die Elutionszeit ist mit 6 - 7 Stunden relativ gering. Der Aktivitätsverlust, bezogen auf die aufgetragene Gesamtaktivität ist durchschnittlich 40%.

Die Anreicherung ist wesentlich höher, wenn man Protein nach anaerober Hitzedenaturierung anstelle des nicht weiter behandelten AS-Niederschlages einsetzt. In den drei derartigen Versuchen war sie 13-, 18- und 18-fach. Nur ca. 20% der aufgetragenen Enzymaktivität gehen verloren.

5. Chromatographie über DEAE-Zellulose

Der verwendete Zelluloseaustauscher wurde vor dem Äquilibrieren mit Puffer mit NaOH und HCl (S. 11) gewaschen; andernfalls waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Tabelle 3 zeigt, daß oberhalb pH 7,0 die Tryptophanoxygenase zu 90% gebunden wird (Puffermolarität 0,1 M).

Tabelle 3: Adsorption der Insektenoxygenase an DEAE-Zellulose bei verschiedenen pH-Werten. Aufgetragen wurden 12 mg Protein, entsprechend 14000 pMol Kynurenin/min. x mg Protein. Nur ca. 10% der aufgetragenen Aktivität werden nicht gebunden (Ausnahme: pH 9,0).

pH	7,1	7,5	8,0	8,25	8,5	9,0
nicht adsorbiertes Protein (mg)	2,86	2,80	2,56	2,80	1,96	1,54
nicht adsorbierte Gesamtaktivität in pMol Kynurenin/min. x mg Protein	1690	1270	1170	1100	620	0

Die Desorption ist bei Verwendung von NaCl bei allen untersuchten pH-Werten mit Ausnahme von pH 9,0 gleich. Die höchste spezifische Aktivität wird erst bei einer Konzentration von 1,5 M NaCl erreicht. Bei pH 9,0 wird nur sehr wenig Oxygenaseaktivität desorbiert, das Enzymprotein wird bei diesem pH-Wert unspezifisch fest an die Zellulose gebunden. Alle unter B II angegebenen Zellulosearten unterscheiden sich nur geringfügig in Adsorptions- und Desorptionsverhalten für die Insektenoxygenase, sodaß DEAE-Zellulose SN von der Firma Serva für die weiteren Versuche verwendet wurde.

Elution mit einem NaCl-Gradienten von einer DEAE-Zellulose-Säule erwies sich wegen der hohen erforderlichen Salzkonzentrationen und der geringen Ausbeute als nicht gangbar. Geeigneter ist Desorption mit schrittweise steigender Phosphatpufferkonzentration (BAILLIE und CHOVIK, 1971). Verwendet wurde 0,01, 0,05, 0,15 und 0,2 M Phosphatpuffer pH 8,0. Bei jedem Pufferwechsel erscheint ein Proteingipfel (Abb. 14), die Tryptophanoxygenase wird bei 0,2 M Phosphatpuffer eluiert.

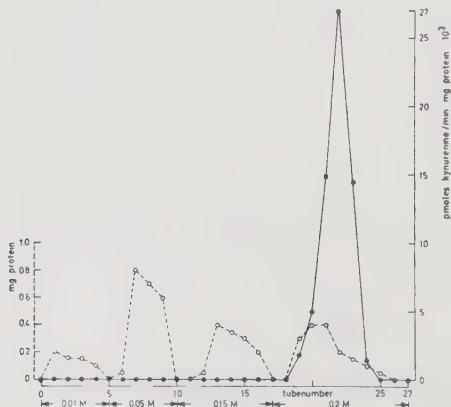


Abb. 14: Elutionsdiagramm der Tryptophanoxygenase durch schrittweise steigende Phosphatpufferkonzentration. Zwischen den Pfeilen sind die Molaritäten des Puffers angegeben, der pH-Wert betrug 8,0.

Man erhält eine 20 - 25-fache Reinigung im Vergleich zum aufgetragenen Protein bei einer Ausbeute von ca. 20%.

6. Isoelektrofocussierung und weitere Versuche

Isoelektrofocussierung auf der 110 ml-Säule von LKB in pH-Gradienten von 10 - 3 und 6 - 3 führte nicht zu einer nachweisbaren Reinigung der Tryptophanoxygenase aus *Phormia*. Weitere Versuche zur Reinigung - Säurefällung (KNOX, 1950), Behandlung des Proteins nach Hitzedenaturierung mit Ribonuklease A und Chromatographie über Hydroxylapatit (CHO-CHUNG und PITOT, 1967), Versetzen des Rohextraktes mit Streptomycinsulfat (ISHIMURA et al., 1970) und Chromatographie über DEAE-Zellulose nach MAYHEW und HOWELL (1971) - waren ebenfalls erfolglos.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 4) sind die Ergebnisse der Anreicherungsversuche zusammengefaßt, Tabelle 5 zeigt die Bilanz der beiden besten Anreicherungen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Anreicherungsversuche für die Tryptophanoxygenase aus *Phormia*.

Anreicherungs-schritt	Anreicherung gegen vorherigen Schritt	Ausbeute bezogen auf vorherigen Schritt	Anzahl der hierfür ausgewerteten Versuche
Protaminsulfat-fällung	1,2	100%	10
AS-Niederschlag	3	90%	10
Hitze-denaturierung	3	50%	3

Fortsetzung Tabelle 4:

Gelfiltration	3 [*] 13 - 18 ^{**}	50% 80%	10 3
DEAE- Chromato- graphie	10 - 25	20%	10

* = Auftrennung von unbehandeltem AS-Niederschlag

** = Auftrennung von AS-Niederschlag nach Hitzedenaturierung

Tabelle 5: Bilanz der beiden besten Anreicherungsversuche. Gesamtaktivität und spezifische Aktivität sind in pMol Kynurenin/min. x mg Protein angegeben. RH = Rohhomogenat; PS = Protaminsulfatfällung; AS = AS-Niederschlag; G-150 = Gelfiltration über Sephadex G-150; DEAE = Chromatographie über DEAE-Zellulose.

Aufarbei- tung		Pro- tein (mg)	Gesamt- aktivi- tät	spezi- fische Aktivi- tät	Anrei- cherung	Aus- beute (%)
RH	I	508	96800	190	1	100
	II	624	134200	215	1	100
PS	I	420	96000	228	1,2	99
	II	568	134000	236	1,1	100
AS	I	127	86200	685	3,6	90
	II	197	116200	591	2,57	87
G-150	I	12,7	43120	3420	18	45
	II	33,5	65600	1960	9,1	49
DEAE	I	0,18	6720	37840	200	7
	II	0,25	8050	32220	150	6

III. EIGENSCHAFTEN DER TRYPTOPHANOXYGENASE AUS PHORMIA TERRAE- NOVAE

1. Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum wurde sowohl im Rohextrakt als auch mit dem grob angereicherten Enzym (AS-Niederschlag) ermittelt (Abb. 15).

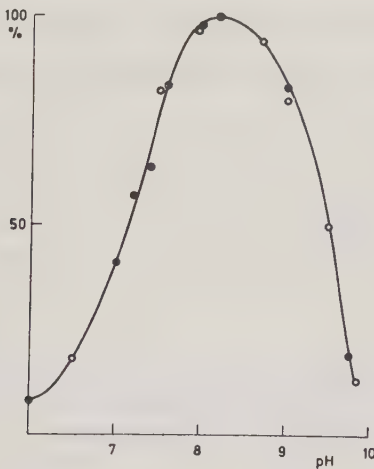


Abb. 15: pH-Optimum der Tryptophanoxigenase aus *Phormia terrae-novae*. Die Aktivität bei pH 8,2 wurde gleich 100% gesetzt. (●) = Rohextrakt; (○) = AS-Niederschlag; Mittelwerte aus 3 (●) und 2 (○) Versuchen.

Die Insektenoxigenase hat ein ausgeprägtes Optimum bei pH 8,2. Dieser Wert unterscheidet sich von Werten an *Drosophila* (pH 7,4, TARTOF, 1969; BAILLIE und CHOVNIK, 1971) und *Schistocerca* (pH 7,5, PINAMONTI und PETRIS, 1966); pH-Optima im alkalischen Bereich wurden aber auch bei anderen Tieren gefunden: pH 8,0 bei verschiedenen Suppressormutanten von *Drosophila* (TARTOF,

1969), pH 8,5 bei Bombyx (LINZEN, 1971) und pH 8,5 - 9,0 bei Gryllus (TIEDT, 1971). Bemerkenswert ist der steile Anstieg bis pH 8,2 und der rasche Abfall bei alkalischeren pH-Werten. Im ansteigenden Ast der Kurve bedingt ein Unterschied von 0,5 pH-Einheiten bereits einen Aktivitätsunterschied von 40%. Für exakte Aktivitätsbestimmungen ist daher genauestens auf die Einhaltung des pH-Wertes zu achten.

2. Substratspezifität der Tryptophanoxygenase

AS-Niederschlag wurde in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer gelöst und mit unterschiedlichen Konzentrationen von D- und L-Tryptophan inkubiert. Die Tryptophanoxygenase reagiert spezifisch nur mit L-Tryptophan. D-Tryptophan wird nicht umgesetzt (Tab. 6a), es hemmt aber selbst in Konzentrationen von 8 mM die Reaktion nicht (Tab. 6b).

Tabelle 6a: Abhängigkeit der Oxygenasereaktion von unterschiedlichen Konzentrationen an D- und L-Tryptophan. Die Oxygenase reagiert spezifisch mit L-Tryptophan, D-Tryptophan wird nicht umgesetzt.

mM	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
D-Try	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Try*	2	6	46	173	523	970	1278	1307

* = Werte in $\mu\text{mol Kynurenin/min.} \times \text{mg Protein}$

Tabelle 6b: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an D-Tryptophan auf die Enzymreaktion bei Inkubation mit 8 mM L-Tryptophan. Angegeben sind spezifische Aktivitäten in $\mu\text{mol Kynurenin/min.} \times \text{mg Protein}$.

mM D-Try	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Aktivität	879	860	900	887	883	850	877	897

3. Substratoptimum und allosterische Eigenschaften der Insekten-oxygenase

Larvalenzym (AS-Niederschlag von 7 Tage alten Larven, die bereits das Futter verlassen hatten) und Imaginalenzym (AS-Niederschlag ca. 10 Tage alter Fliegen) wurde mit unterschiedlichen Tryptophankonzentrationen inkubiert. Wie Abb. 16 zeigt, geht die Reaktionsgeschwindigkeit bei höherer Substratkonzentration wieder zurück, es liegt eine Hemmung vor. Die optimale Konzentration liegt für das Enzym aus beiden Entwicklungsstadien bei 8 mM Tryptophan.

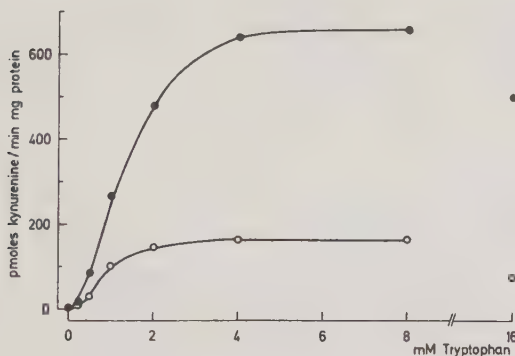


Abb. 16: Substratabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Tryptophanoxygenase bei Larven (○) und Imagines (●). Angegeben sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein.

Substrathemmung des Enzyms wurde bisher nur von TIEDT (1971) bei *Gryllus* und LINZEN (1971) bei *Bombyx* beschrieben. In Arbeiten anderer Autoren (EGELHAAP, 1963; MARZLUF, 1965a; TARTOF, 1969;

BAILLIE und CHOVIK, 1971) wird eine Hemmung der Oxygenase nicht erwähnt, es wurden aber durchwegs niedrigere Substratkonzentrationen verwendet. Allerdings läßt sich bei MARZLUF (1965b) in Abb. 1A erkennen, daß bei 10 mM Tryptophan die Reaktionsgeschwindigkeit abfällt, höhere Konzentrationen wurden anscheinend nicht eingesetzt.

Folgende Merkmale der Reaktionskinetik sind von Bedeutung:

Der Kurvenverlauf folgt keiner Michaelis-Menten-Kinetik sondern ist sigmoidal (Abb. 17).

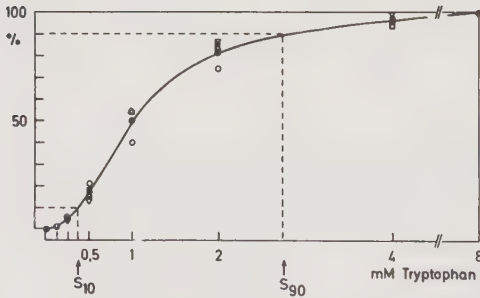


Abb. 17: Reaktionskinetik der Tryptophanoxygenase bei steigender Substratkonzentration. Aufgetragen sind 4 verschiedene Versuchsreihen und Mittelwerte, wobei die Aktivität bei 8 mM Tryptophan gleich 100% gesetzt wurde. S_{10} ist die Substratkonzentration bei 10% der Maximalgeschwindigkeit, S_{90} bei 90% der Maximalgeschwindigkeit (s.S. 36).

Daher wird für das Enzym keine Michaelis-Konstante angegeben, sondern die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit, S_{50} . Sie beträgt für Imaginal- und Larvalenzym 1,25 -

$1,33 \times 10^{-3}$ M/l. Damit stimmt sie mit Messungen von KAUFMAN ($1,0 \times 10^{-3}$ M/l; 1962), MARZLUF ($1,0 \times 10^{-3}$ M/l; 1965a), PINAMONTI und PETRIS ($0,6 \times 10^{-3}$ M/l; 1966) und TARTOF ($1,43 - 2,93 \times 10^{-3}$ M/l; 1969) an anderen Objekten gut überein.

Der sigmoidale Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Substratkonzentration weist auf allosterische Eigenschaften des Enzymproteins hin: Untereinheiten der Oxygenase müssen in positiver Wechselwirkung (Kooperation) zueinander stehen. Um ein Maß für die Kooperativität zu gewinnen, wurden die Kurven als "Hill-plots" (Abb. 18) nach der Gleichung

$$\log \frac{v}{v_{\max} - v} = \log K + n \times \log [c]$$

aufgetragen (HILL, 1910). Dabei ist K die Assoziationskonstante für die Bildung des Enzym-Substratkomplexes und n die Steigung der Geraden, der sogenannte Hill-Parameter.

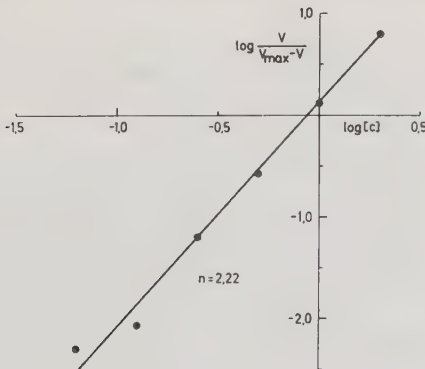


Abb. 18: Hill-plot der Tryptophanoxygenase aus Imagines. Bei diesem Versuch ist die Steigung n der Geraden 2,22.

Für die Tryptophanoxygenase wurde er graphisch zu 1,89 - 2,25

bestimmt. Aus der Ableitung der Hill-Gleichung ist leicht einzusehen, daß die Zahl der Untereinheiten in einem allosterischen Enzym mindestens gleich n sein muß. Bei unendlich hoher Kooperativität wäre sie gleich n , bei realen Systemen ist sie immer größer. Die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* muß daher mindestens aus 3 Untereinheiten bestehen, aus Gründen der Symmetrie sind 4 Untereinheiten wahrscheinlicher.

Eine andere Möglichkeit, den Hill-Parameter zu errechnen, ergibt sich aus dem Verhältnis der Substratkonzentrationen bei 90% und 10% maximaler Enzymaktivität (s. Abb. 17): Bei einer hyperbolischen Kinetik ist es gleich 81, bei einer sigmoidalen Reaktionskinetik gleich der n -ten Wurzel aus 81 (SEGEL, 1968). n ist gleich dem Hill-Parameter. Aus allen vorliegenden Daten errechnet er sich zu 2,15 - 2,33.

4. Versuche zu Dissoziation und Reassoziation der Tryptophanoxygenase

Bei der Tryptophanoxygenase aus *Pseudomonas* wurden 4 inaktive Untereinheiten gefunden (POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON, 1969; KOIKE, POILLON und FEIGELSON, 1969). Wenn sich die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* ebenfalls aus mehreren Untereinheiten aufbaut, sollte es möglich sein, durch Dialyse bei alkalischen pH-Werten Dissoziation und bei pH 8,2 Reassoziatio

zu erhalten. Das Enzym müßte in Untereinheiten zerfallen, die bei neutralem oder leicht alkalischem pH reaggregieren könnten. Zur Dissoziation wurde gegen Puffer von pH 10,5 dialysiert. Um zu gewährleisten, daß das Enzym immer mit Cofaktor abgesättigt ist, wurde dem Dialysepuffer Methämoglobin beige

fügt.

Die Aktivität der Oxygenase nimmt bei Dialyse gegen pH 10,5 in 48 Stunden um 76% ab (Abb. 19), der Vergleichswert bei Dialyse gegen pH 8,2 nur um 11%. Bei anschließend 24-stündiger Rückdialyse gegen pH 8,2 ist eine Aktivitätszunahme um 15% zu beobachten, während bei weiterer Dialyse gegen pH 10,5 weitere 10% Aktivitätsverlust auftreten.

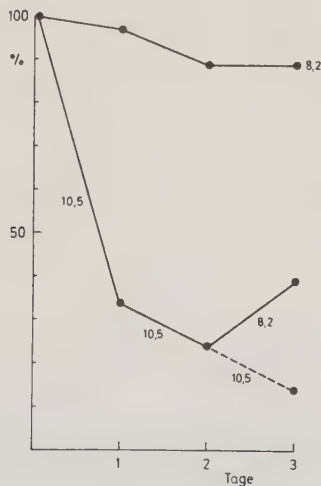


Abb. 19: Dialyse der Tryptophanoxygenase gegen pH 10,5 und Rückdialyse gegen pH 8,2. Der Aktivitätswert zu Beginn des Versuches wurde gleich 100% gesetzt. Die obere Kurve zeigt die Vergleichsdialyse gegen pH 8,2, die untere Kurve Dialyse gegen pH 10,5 und Rückdialyse gegen pH 8,2.

Dieser Versuch ist ein Einzelversuch und muß in weiteren Versuchen erst gesichert werden; er weist aber darauf hin, daß die Tryptophanoxygenase bei *Phormia* tatsächlich aus mehreren Untereinheiten besteht, die dissoziieren (= Aktivitätsverlust) und reaggregieren (= Aktivitätszunahme) können.

5. Bindung von Sauerstoff

Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration wurde mit Hilfe der auf S. 12 beschriebenen Apparatur gemessen. Die Sättigungskurve hat offensichtlich einen sigmoidalen Verlauf (Abb. 20).

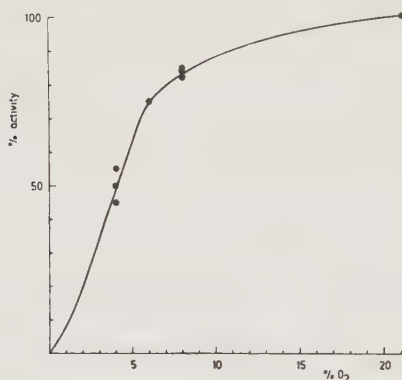


Abb. 20: Reaktionskinetik der Tryptophanoxygenase bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen und 8 mM Tryptophan. Die Aktivität der Oxygenase bei Beladung mit Luftsauerstoff wurde gleich 100% gesetzt. Es sind Werte aus zwei Versuchen und die Mittelwerte dargestellt.

Die Partialdrucke des Sauerstoffes wurden nach WOLVEKAMP (1938) mit der Formel

$$p_{O_2} = \frac{20,95}{100} \times \frac{v}{V + v} \times (B - W)$$

ermittelt. Dabei ist B der Barometerdruck, W der Wasserdampfdruck bei Versuchstemperatur, v das eingeströmte Luftvolumen und V das Gesamtvolumen der Versuchsanlage. Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (S_{50}) beträgt $3,67 \times 10^{-5}$ M/l. Der Wert stimmt gut mit Ergebnissen bei Bak-

terien und Säugern ($8,5 \times 10^{-5}$ M/l; TANAKA und KNOX, 1959) und Bakterien ($6,0 \times 10^{-5}$ M/l; ISHIGURO et al. 1970) überein.

6. "Lag-Phase" der Tryptophanoxygenase

BAILLIE und CHOVIK (1971) fanden erstmals bei *Drosophila*, daß die Geschwindigkeit der Oxygenasereaktion erst nach 30 Min. konstant ist, daß also eine sogenannte lag-Phase vorliegt. Auch für das Enzym aus *Phormia terraenovae* wurde diese lag-Phase gefunden. Zur Definition der lag-Phase siehe Abb. 21.

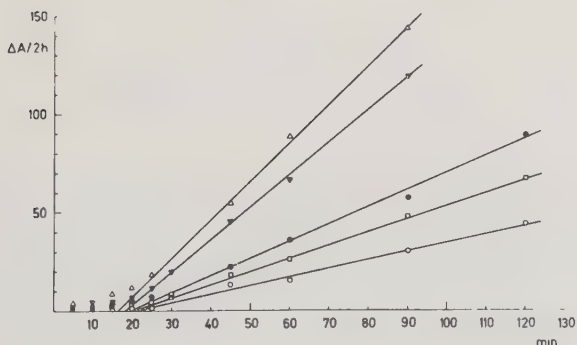


Abb. 21: Lag-Phase der Tryptophanoxygenase aus *Phormia terraenovae*, gemessen bei optimalen Inkubationsbedingungen. Dargestellt sind 5 Versuche aus unterschiedlichem Tiermaterial. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse gibt die Dauer der lag-Phase an (durchschnittlich 20 Min.).

Es konnte gezeigt werden, daß die lag-Phase abhängig von der Tryptophankonzentration ist: Enzym von AS-Niederschlägen wurde mit unterschiedlichen Tryptophankonzentrationen 30 Min. vorinkubiert, dann die Molarität des Tryptophans im Inkubationsansatz auf 8 mM erhöht und der zeitliche Reaktionsablauf ver-

folgt. Es zeigt sich, daß bei Vorinkubation mit niedrigen Tryptophankonzentrationen die lag-Phase bis zu 20 Min. verlängert wird (Abb. 22).

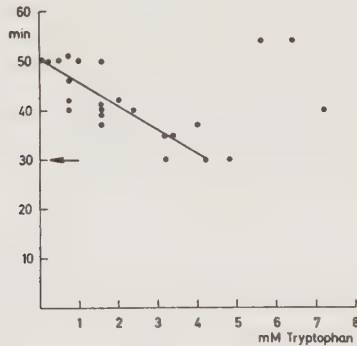


Abb. 22: Verlängerung der lag-Phase der Tryptophanoxygenase in Abhängigkeit von der Tryptophankonzentration. Abszisse: Tryptophankonzentration, mit der 30 Min. vorinkubiert wurde; Ordinate: lag-Phase bei Inkubation mit 8 mM Tryptophan. Erst nach 30 Min. Vorinkubation (Pfeil) mit den entsprechenden Tryptophankonzentrationen wurde nach Erhöhung der Tryptophanmolarität auf 8 mM die lag-Phase gemessen. Dargestellt sind Werte aus mehreren, voneinander unabhängigen Versuchen.

Dieser Befund ist wichtig für Aktivitätsbestimmungen mit niedrigen Tryptophankonzentrationen, bei welchen diese verlängerte lag-Phase berücksichtigt werden muß. Ob die bei Vorinkubation mit 5,6, 6,4 und 7,2 mM Tryptophan erhaltenen Werte zufällige Fehler darstellen, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

Vorinkubation mit 1 mM α -Methyltryptophan, welches beim Säuger- und Bakterienenzym als allosterischer Effektor fungiert (TANAKA

und KNOX, 1959; KOIKE, POILLON und FEIGELSON, 1969; FORMAN und FEIGELSON, 1972), hebt die lag-Phase für Tryptophan auf: Die Reaktion verläuft mit Beginn der Tryptophanzugabe linear (Abb. 23).

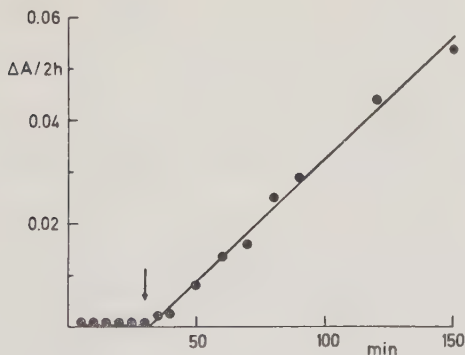


Abb. 23: Zeitliche Abhängigkeit der Tryptophanoxygenasereaktion bei 30 Min. Vorinkubation mit 1 mM α -Methyltryptophan. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Tryptophanzugabe an.

α -Methyltryptophan allein wird vom Enzym nicht umgesetzt. Auch auf die Insektenoxygenase scheint α -Methyltryptophan also einen aktivierenden Einfluß auszuüben (siehe Diskussion).

Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bei 8 mM Tryptophan erst nach ca. 20 Min. linear verläuft, wurden alle Inkubationsansätze 30 Min. bei 37°C vorinkubiert.

7. Hemmung der Tryptophanoxygenase durch CN^- und Cu^{++}

Versuche zur Hemmung der Oxygenase sind in Abb. 24 zusammengestellt.

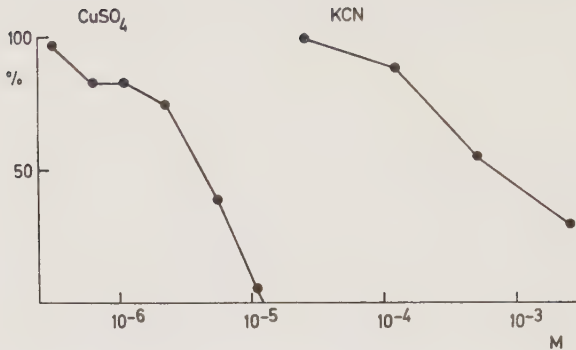


Abb. 24: Hemmung der Tryptophanoxygenase durch CN^- - und Cu^{++} -Ionen.

KCN hemmt die Oxygenase in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ M/l zu 70%. Dieser Wert stimmt größenordnungsmäßig mit dem für das Säugerenzym gemessenen Wert überein ($2,0 \times 10^{-3}$ M/l bewirkt eine 84 %ige Hemmung des Enzyms; WEBER und WISS, 1966). Sehr viel empfindlicher ist die Insektenoxygenase gegenüber Cu^{++} -Ionen: Schon bei einer Molarität von $1,1 \times 10^{-5}$ M/l wird das Enzym zu 100% gehemmt. Auf den Einfluß von Cu^{++} -Ionen soll weiter unten in der Diskussion eingegangen werden.

8. Untersuchungen zur Stabilität und Natur des Cofaktors der Insektenoxygenase

Der Cofaktor der Oxygenase bei Säugetieren, höchstwahrscheinlich Hämatin, ist nur leicht an das Apoenzym gebunden (GREENGARD und FEIGELSON, 1962; GREENGARD, 1964). Da frühere Versuche zum Nachweis eines dissoziablen Cofaktors des Insektenenzym

zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt hatten (MARZLUF, 1965a; BAILLIE und CHOVIK, 1971), wurden Dialyseversuche und Versuche zur Aktivierung der Tryptophanoxygenase aus *Phormia* durchgeführt. Alle Versuche wurden bei 4 - 5°C ausgeführt.

a. Dialyseversuche

Protein eines AS-Niederschlags wurde in 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 8,2, enthaltend unterschiedliche Mengen von EDTA, gelöst und gegen das hundertfache Volumen des gleichen Puffers, dem zur Hemmung der Tyrosinaseaktivität 1% einer gesättigten Phenylthioharnstofflösung zugesetzt worden war, dialysiert. Der Außenpuffer wurde nach 24 Stunden erneuert. Zum Vergleich wurde eine Lösung des gleichen Proteins ohne Dialyse in der Kälte aufbewahrt.

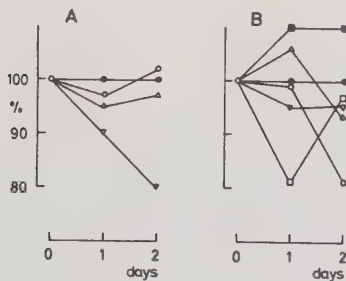


Abb. 25: Versuche zur Dialysierbarkeit des Cofaktors der Tryptophanoxygenase von *Phormia terraenovae*. A: Dialyse gegen TRIS-HCl-Puffer ohne Zusatz. Aufgetragen sind 3 verschiedene Versuche, die Aktivität des Vergleichsproteins wurde gleich 100% gesetzt. B: Dialyse gegen verschiedene Konzentrationen von EDTA. (□) = 1 mM; (■) = 5 mM; (○) = 10 mM; (▽) = 50 mM; (●) = Vergleichsprotein.

Aus Abb. 25 folgt, daß ohne oder mit EDTA bis zu Konzentrationen von 50 mM die Tryptophanoxygenaseaktivität im Vergleich zum nicht dialysierten Protein praktisch konstant bleibt. Der Cofaktor der Tryptophanoxygenase aus *Phormia* muß also sehr fest an das Apoenzym gebunden sein. Der Einwand, daß er nicht durch die Poren des Dialyseschlauches gelangen könnte, wurde für Hämatin (MG = 650) als eine sehr wahrscheinliche Substanz durch Dialyse unter den gleichen Bedingungen entkräftet: Nach 24 Stunden sind nur noch 70% der eingesetzten Menge im Dialyseschlauch nachzuweisen.

b. Hämatin - Cofaktor der Tryptophanoxygenase aus *Phormia*?

Die Aktivität der Säuger- und Bakterienoxygenase kann in vitro nach Acetonbehandlung des Enzyms durch Hämatin wiederhergestellt werden (GREENGARD, 1964; FEIGELSON, ISHIMURA und HAYAISHI, 1965). Obwohl die *Phormia*oxygenase durch Dialyse nicht zu inaktivieren ist und ihr Cofaktor demnach sehr fest gebunden sein muß, läßt sich ihre Aktivität durch Zugabe von verschiedenen Porphyrinen steigern.

Tabelle 7: Aktivierung der Tryptophanoxygenase durch verschiedene Eisenporphyrine. Für den Versuch wurden 2 unterschiedliche Porphyrinkonzentrationen (2,7 und 6,58 nM) verwendet. Die angegebenen Werte sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein.

Eisenporphyrin	2,7 nM	6,58 nM
Hämatin	633	625
Häminchlorid	654	654
Hämatoporphyrin-dihydrochlorid	400	430
Vergleich ohne Zusatz	420	

Aus Tab. 7 geht hervor, daß Zusatz von Hämatin und Häminchlorid eine Aktivierung des Enzyms bewirkt, während eine Aktivierung durch Hämatoporphyrin-Dihydrochlorid erwartungsgemäß nicht nachzuweisen ist.

Für Hämatin und Methämoglobin, welches BAILLIE und CHOVIK (1971) bei der Aktivierung der Tryptophanoxygenase aus *Drosophila* als Hämatinspender benützten, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Porphyrinkonzentration gemessen (Abb. 26).

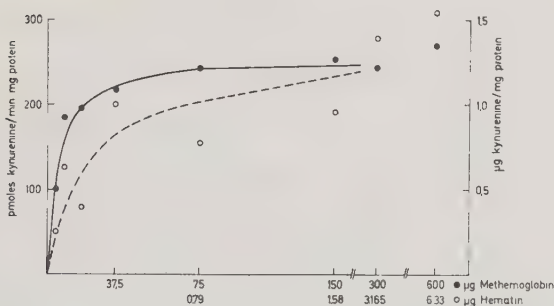


Abb. 26: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxygenase aus *Phormia* von unterschiedlichen Hämatinkonzentrationen (gestrichelte Kurve, rechte Ordinate) und Methämoglobinkonzentrationen (durchgezogene Kurve, linke Ordinate).

Bei den Messungen ist zu beachten, daß wegen des endogenen Cofaktors die Ausgangsaktivität nicht gleich Null ist. Es ist erstaunlich, daß durch Zugabe von Eisenporphyrinen überhaupt eine Steigerung der Oxygenaseaktivität erreicht werden kann.

Zieht man die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz von den übrigen Werten ab, so ergibt sich für das zusätzliche Hämatin eine K_M von $3,85 \times 10^{-7}$ M/l, für das in Form von Methämoglobin zugefügte Hämatin eine K_M von $3,25 \times 10^{-7}$ M/l. Die K_M für Hämatin beim Säugerenzym wurde zu 10^{-8} M/l bestimmt (GREENGARD und FEIGELSON, 1962).

c. Spektrum der oxydierten und reduzierten Form der Oxygenase
TANAKA und KNOX (1959), MAENO und FEIGELSON (1967), TOKUYAMA (1968) und ISHIMURA et al. (1970) fanden in UV/VIS-Spektren hochgereinigter Tryptophanoxygenase aus Rattenlebern und Bakterien Unterschiede in der "Soret-Region" zwischen oxydiertem und reduziertem Enzym: Das Maximum bei 405 nm (oxydiert) verschiebt sich bei Reduktion nach 432 nm.

Eine ca. 80-fach angereicherte Präparation der Oxygenase aus *Phormia* wurde in Halbmikro-Langwegküvetten (Inhalt 0,7 ml; Lichtweg 5 cm.) in der Soret-Region untersucht (Abb. 27, S. 47). Wegen der starken Opaleszenz der Lösungen steigt die scheinbare Extinktion zu kürzere Wellenlängen hin kontinuierlich an. Da sich die Proben etwas unterscheiden, wurden die Spektren auf die Extinktion bei 370 nm normiert. Bei ca. 400 nm findet sich eine Schulter im Spektrum des oxydierten Enzyms, die durch Zugabe von Natriumthionit nach 428 nm verschoben wird. Im Differenzspektrum (oxydierte minus reduzierte Form) zeigt sich ein Maximum bei 400 nm (= oxydierte Form) und ein Minimum zwischen 430 und 440 nm (= reduzierte Form). Das Minimum tritt nicht unmittelbar hervor, da die beiden Lösungen eine sehr hohe Grundextinktion haben. Die kleine Differenz, welche

durch oxydierten gegenüber reduziertem Cofaktor verursacht wird, wird durch die größere Differenz zwischen den Grundextinktionen überdeckt. Aus der Lage von Maximum und Minimum bei 400 und 430 - 440 nm wird aber recht wahrscheinlich, daß auch bei der Insektenoxygenase ein Eisenporphyrin als Cofaktor fungiert. Unklar bleibt weiterhin, ob es sich dabei tatsächlich um Hämatin handelt.

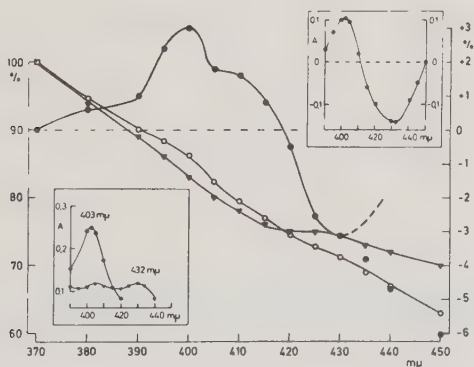


Abb. 27: Spektren der oxydierten (○) und reduzierten (▼) Form der Tryptophanoxygenase aus *Phormia*, aufgenommen in 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0, enthaltend 1 mM Tryptophan, sowie Differenzspektrum von oxydierter minus reduzierter Form des Enzyms (●). Die Extinktion bei 370 nm wurde gleich 100% gesetzt (s.S. 46). Bildausschnitt links unten: Spektren von oxydierter (○) und reduzierter (▼) Form der Tryptophanoxygenase aus *Pseudomonas* (TANAKA und KNOX, 1959); Bildausschnitt rechts oben: Differenzspektrum von oxydierter und reduzierter Form der Tryptophanoxygenase aus *Pseudomonas* (ISHIMURA et al., 1970).

9. Molekulargewichtsbestimmung

Eine Säule (2,5 x 120 cm) mit Sephadex G-150 wurde vor und nach dem Lauf einer Oxygenasepräparation mit Chymotrypsinogen

(MG = 25000), Ovalbumin (MG = 45000), Rinderserumalbumin (MG = 67000), Aldolase (MG = 147000) und Katalase (MG = 240000) geeicht (Abb. 28).

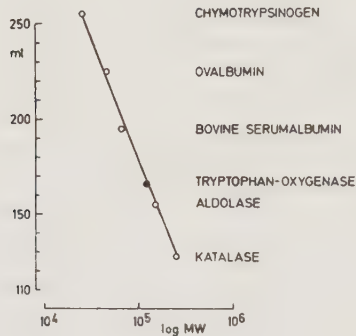


Abb. 28: Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Tryptophanoxygenase. Länge der Säule: 120 cm; Durchmesser: 2,5 cm; Elutionspuffer: 0,01 M Phosphat pH 8,0.

Für die Oxygenase ergibt sich aus dem Elutionsvolumen ein Molekulargewicht von 120000 (Anzahl der Versuche: 5). Für das Enzym aus *Pseudomonas* wurde 121000 (POILLON, MAENO, KOIKE und FEIGELSON, 1969) und für das aus Bakterien und Rattenlebern 103000 (TOKUYAMA, 1968) gemessen. BAILLIE und CHOVNIK (1971) bestimmten durch Chromatographie über Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von 150000 bei *Drosophila*. Die Autoren geben allerdings nicht Zahl der Versuche und Streuung an.

IV. PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER TRYPTOPHANOXYGENASE IM STOFFWECHSEL VON PHORMIA TERRAENOVAE

1. Versuche zur Induktion

Die Tryptophanoxygenase wird bei Säugern durch Applikation ihres Substrates oder verschiedener Steroide induziert (TANAKA und KNOX, 1959; CLOUET und GORDON, 1959; CIVEN und KNOX, 1960; GREENGARD und FEIGELSON, 1960; 1961; SCHIMKE, SWEENEY und BERLIN, 1965; KNOX, 1966; FRANZ und KNOX, 1967; SEGLEN und JERVILL, 1969). Versuche an Insekten verliefen bisher widersprüchlich. RIZKI und RIZKI (1963) fanden nach Verfütterung von Tryptophan an *Drosophila*-Larven erhöhte Kynureninakkumulation im Fettkörper, MARZLUF (1965b) bestätigt diese Befunde. EGELHAAF (1963) und LEIBENGUTH (1967a) beobachteten bei *Ephesia* beziehungsweise *Habrobracon* keine Induktion des Enzyms.

In 7 Tage alte Larven wurde die 10-fache Menge, in ca. 10 Tage alte Imagines bis zur 40-fachen Menge ihres Eigengehaltes an Tryptophan injiziert (Injektionsvolumen: 5 μ l). Zum Vergleich wurde in Tiere gleichen Alters und gleichen Zuchtansatzes das gleiche Volumen einer Ringerlösung injiziert und die Tiere nach 24 Stunden aufgearbeitet. Als weitere Vergleichsgruppe dienten nicht injizierte Tiere. Es zeigt sich eindeutig, daß die Tryptophanoxygenase weder bei Larven (Tab. 8a), noch bei Imagines (Tab. 8b) durch die angebotenen Tryptophankonzentrationen induziert wird.

Tabelle 8a: Versuche zur Induktion der Tryptophanoxygenase bei Larven von *Phormia*. Die angegebenen Werte sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein. Zur geringen spezifischen Aktivität der larvalen Oxygenase vergl. Abb. 29.

Versuch	I	II	III
Vergleichstiere nicht injiziert	23	29	54
Vergleichstiere mit Ringer inj.	25	32	44
45 µg Tryptophan	27	26	55

Tabelle 8b: Versuche zur Induktion der Tryptophanoxygenase bei Imagines von *Phormia*. Bei Versuch I und II wurden die Tiere bis zum AS-Niederschlag aufgearbeitet. Die angegebenen Werte sind spezifische Aktivitäten in pMol Kynurenin/min. x mg Protein.

Versuch	I	II	III
Vergleichstiere nicht injiziert	842	695	182
Vergleichstiere mit Ringer inj.	735	597	193
1 µg Tryptophan	641	-	-
5 µg Tryptophan	794	590	-
10 µg Tryptophan	-	560	197
20 µg Tryptophan	-	-	172

2. Aktivitätsverlauf der Tryptophanoxygenase während der Entwicklung von *Phormia*

Für diese Versuche wurden Rohextrakte ganzer Tiere eingesetzt. Die spezifische Aktivität der Oxygenase nimmt einen typisch U-förmigen Verlauf (Abb. 29). In jungen Larven ist die Aktivität hoch (185 pMol Kynurenin/min. x mg Protein), sinkt während der Puppenruhe auf ca. 20 pMol Kynurenin/min. x mg Protein ab

und steigt in der Imago auf den ca. 10-fachen Wert an. In frisch abgelegten Eiern von *Phormia* konnte das Enzym nicht nachgewiesen werden.

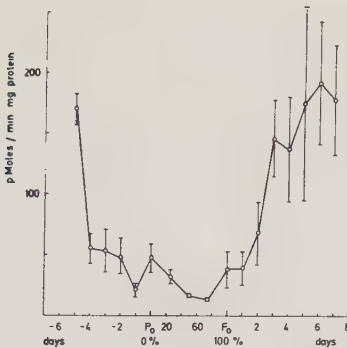


Abb. 29: Aktivitätsverlauf der Tryptophanoxygenase während der Entwicklung von *Phormia*. Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus 5 Versuchsreihen mit unterschiedlichem Tiermaterial.

3. Mischinkubationen von Pupal- und Imaginalenzym

Niedrige Aktivität der Tryptophanoxygenase während des Puppenstadiums wurde früher bereits von LEIBENGUTH (1967b) bei *Habrobracon* gefunden. LEIBENGUTH vermutete einen spezifischen Hemmstoff in den Puppen und konnte einen solchen auch durch einige Versuche wahrscheinlich machen. Diese Frage wurde daher auch an *Phormia* untersucht. Puppen- und Imaginalextrakte wurden im Verhältnis 20 : 80, 50 : 50 und 80 : 20 gemischt und inkubiert. Falls ein stadienspezifischer Hemmstoff die niedrigen Aktivitäten der Oxygenase während der Puppenruhe verursacht, sollte auch das Imaginalenzym durch diese Substanz gehemmt werden.

Es zeigt sich aber, daß die Aktivität der Tryptophanoxygenase lediglich proportional dem Anteil der Puppenhomogenate abnimmt (Abb. 30). Mischinkubationen von AS-Niederschlägen ergaben das gleiche Bild.

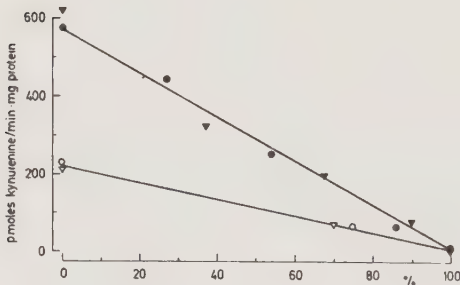


Abb. 30: Mischinkubationen von Pupal- und Imaginalenzym der Tryptophanoxygenase zum Nachweis eines spezifischen Hemmstoffes während der Puppenruhe von *Phormia*. Offene Symbole: Rohextrakte (2 Versuche); geschlossene Symbole: AS-Niederschläge (2 Versuche).

4. Verteilung der Tryptophanoxygenase in einzelnen Organen von *Phormia*

Von 7 Tage alten Larven wurden Malpighische Gefäße, Darm, Fettkörper und Hautmuskelschlauch, von Imagines (6 - 8 Tage alt) Malpighische Gefäße, Darm, Fettkörper, Gonaden, Augen und Thoraxmuskulatur untersucht. Bei Larven (Tab. 9) findet sich die höchste spezifische Aktivität in den Malpighischen Gefäßen, das Enzym wird aber auch in den anderen untersuchten Geweben gefunden.

Tabelle 9: Spezifische Aktivität (in pMol Kynurenin/min. x mg Protein und Standardabweichung der Mittelwerte) und Gesamtaktivität der Tryptophanoxygenase in einzelnen Geweben von Larven und Imagines von *Phormia*. Die Gesamtaktivität errechnet sich aus den Mittelwerten der spezifischen Aktivität der einzelnen Organe und dem durchschnittlichen Proteingehalt der jeweiligen Homogenate.

Gewebe	Larven, 7 Tage alt (n = 4)		Imagines, 6 - 8 Tage alt (n = 6)	
	spez. Akt.	Gesamtakt.	spez. Akt.	Gesamtakt.
Fettkörper	60 $\pm$ 20	260	2200 $\pm$ 970	4900
Malpighische Gefäße	210 $\pm$ 55	100	990 $\pm$ 380	640
Darm	90 $\pm$ 39	130	250 $\pm$ 56	445
Hautmuskelschlauch	34 $\pm$ 17	180	-	-
Thoraxmuskulatur	-	-	250 $\pm$ 26	1270
Ovarien	-	-	100 $\pm$ 50	140
Hoden	-	-	1220 $\pm$ 350	195
Augen	-	-	0	0

Bei Imagines wird die Oxygenase mit unterschiedlichen Aktivitäten in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Augen gefunden (Tab. 9). Bei der Inkubation der Augenhomogenate wurde eine scheinbare Kynureninbildung, die durch Zerfall von Xanthommatin unter den leicht alkalischen Inkubationsbedingungen vorgetäuscht werden kann (PINAMONTI und PETRIS, 1966), durch geeignete Kontrollen (Zugabe des Substrates erst am Ende der Inkubation) eliminiert. Unter diesen Kautelen erwiesen sich

die Augen von *Phormia* als frei von Oxygenaseaktivität.

Bei Larven und Imagines findet sich die höchste Gesamtaktivität im Fettkörper, sodaß dieses Gewebe wohl hauptsächlich für den Tryptophanabbau verantwortlich sein dürfte.

D. D I S K U S S I O N

Die Tryptophanoxygenase aus *Phormia terraenovae* konnte 150- bis 200-fach durch Ammonsulfatfällung, Gel-Filtration und Chromatographie über DEAE-Zellulose angereichert werden. Mit 5 - 10% Wiederfindung, bezogen auf die Ausgangsaktivität, ist die Ausbeute ähnlich niedrig wie bei Säuger- und Bakterienenzym. Aus den Daten über die Wirksamkeit der einzelnen Reinigungsschritte wäre theoretisch eine weit höhere Anreicherung zu erwarten; diese konnte bei einer Großaufarbeitung nicht realisiert werden, vermutlich wegen der größeren Zeitdauer dieses Versuches und möglicherweise bakteriellen Infektionen.

Es sollen nun zunächst die Eigenschaften der Oxygenase aus *Phormia* mit denen des Enzyms aus der Säugerleber und aus *Pseudomonas* verglichen und im Anschluß die biologische Bedeutung der Oxygenase im Stoffwechsel von *Phormia* besprochen werden.

1. Vergleich der Eigenschaften der Tryptophanoxygenase aus Rattenlebern und Bakterien mit dem Insektenenzym

"Lag-Phase"

Ebenso wie im Falle des Säuger- und Bakterienenzyms zeigt die Oxygenasereaktion mit *Phormia*-Extrakten eine Anlaufzeit (lag-

Phase). KNOX (1966), KNOX und PIRAS (1967), KNOX, PIRAS und TOKUYAMA (1967) und PIRAS und KNOX (1967) deuten dies als Aktivierungsprozeß für das Enzym. Sie nehmen an, daß das Enzym eine allosterische und eine katalytische Bindungsstelle für Tryptophan besitzt und daß in Gegenwart von Tryptophan 1. die Konjugation des Cofaktors mit dem Apoenzym und 2. die Reduktion des Cofaktors erfolgt. Durch Versuche zur Hemmung der Konjugation durch Globin und aerobe (= oxydiertes, inaktives Enzym) oder anaerobe (= reduziertes, aktives Enzym) Inkubation mit oder ohne Tryptophan gelangen sie zu der Ansicht, daß die Konjugation sehr rasch erfolgt und daß der Reduktionsschritt für die lag-Phase verantwortlich ist. Das reduzierende Agens soll das Tryptophan selbst sein. BRADY, FORMAN und FEIGELSON (1971) finden dagegen, daß die durch Ascorbinsäure reduzierte Form der Oxygenase aus Rattenlebern ohne lag-Phase aktiv ist (vgl. weiter unten das Verhalten des Enzyms aus *Pseudomonas*).

Anders verhält sich die Tryptophanoxxygenase aus *Phormia*: Obwohl von Anfang an im reduzierenden Milieu (Mercaptoäthanol) gearbeitet wird, dauert die lag-Phase durchschnittlich 20 Minuten (S. 39). Für die lag-Phase müssen also andere Mechanismen verantwortlich sein. Konjugation des Cofaktors mit dem Apoenzym scheidet aus, da der Cofaktor des Enzyms bereits fest gebunden ist. Einen Hinweis auf einen andersartigen Mechanismus gibt folgender Versuch: Durch Vorinkubation mit 1 mM α -Methyltryptophan, welches beim Enzym aus *Pseudomonas* als allosterischer Effektor fungiert (KOIKE und FEIGELSON, 1971), wird beim Enzym aus *Phormia* bei Inkubation mit Tryptophan die lag-Phase aufgehoben (S. 41). α -Methyltryptophan wird weder selbst umgesetzt, noch

hemmt es die Reaktion in den applizierten Konzentrationen. Eine Denkmöglichkeit zur Erklärung der lag-Phase wäre dann, daß das Enzym zunächst aus einer nicht aktiven Form (z.B. Untereinheiten) zu einer aktiven assoziieren muß. Wenn das Insektenenzym im Homogenatüberstand dissoziiert vorliegt und α -Methyltryptophan bzw. Tryptophan ein Zusammentreten der Untereinheiten bewirken, so würde dieser Vorgang bei den hohen Verdünnungen des Enzyms sicher längere Zeit beanspruchen und die Dauer der lag-Phase auch bei hohen Effektorkonzentrationen erklären.

Eventuell wäre auch für das Enzym aus *Pseudomonas* das Entstehen der lag-Phase durch Konformationsänderungen des Proteinmoleküls zu erklären: Selbst im reduzierenden Milieu ist nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxygenase erst nach ca. 10 Min. linear (Abb. 1 bei BRADY, FORMAN und FEIGELSON, 1971).

Ob eine aktivierende Konformationsänderung des Insektenzyms durch α -Methyltryptophan bewirkt wird, sollte sich durch Vorinkubation mit dieser Substanz und Inkubation mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen nachweisen lassen: die sigmoidale Reaktionskinetik (S. 38) sollte, wie es nach dem Modell von MONOD, WYMAN und CHANGEUX (1965) gefordert wird, hyperbolisch werden. Für das Bakterienenzym ist dies von KOIKE und FEIGELSON (1971) gesichert worden. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß allosterische und katalytische Bindungsstelle für Tryptophan unterschiedlich sind. FORMAN und FEIGELSON (1972) glauben sogar durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an α -Methyltryptophan und Tryptophan nachwei-

sen zu können, daß pro katalytisch wirksamer Bindungsstelle 3 allosterische Bindungsstellen vorhanden sind.

Es wurde oben gezeigt, daß die lag-Phase der Oxygenasereaktion mit steigenden Tryptophankonzentrationen verkürzt wird (S. 40). Bei optimaler Substratkonzentration beträgt die lag-Phase aber immer noch 20 Minuten. Man könnte daher auf den Verdacht kommen, daß die sigmoidale Reaktionskinetik, die bei niedrigen Substratkonzentrationen zu erkennen ist, durch die Verlängerung der lag-Phase verursacht wird und daß die Kinetik der Enzymreaktion in Wirklichkeit einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgt. Durch einstündige Vorinkubation - die lag-Phase ist dann auch bei niedrigen Substratkonzentrationen verstrichen und der Reaktionsverlauf mit Sicherheit linear - und Verkürzung der Inkubationsdauer auf 1 Stunde konnte gezeigt werden, daß die Enzymkinetik tatsächlich sigmoidal ist, die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* also ein allosterisches Enzym ist, welches durch positive homotrope und negativ heterotrope Wechselwirkungen seiner verschiedenen Ligandenbindungsorte gekennzeichnet ist. Der Hill-Parameter n , ein Maß für die Kooperativität eines Enzyms, wurde graphisch (S. 35) und rechnerisch aus dem $S_{90} - S_{10}$ -Verhältnis (S. 36) bestimmt und liegt zwischen 1,89 und 2,33. Daher ist zu erwarten, daß mindestens 3 Untereinheiten am Aufbau des Enzymmoleküls beteiligt sind; aus Gründen der Symmetrie sind 4 Untereinheiten wahrscheinlicher. POILLON, KOIKE, MAENO und FEIGELSON (1969) weisen tatsächlich 4 Untereinheiten bei der Oxygenase aus *Pseudomonas* nach. Die Untereinheiten allein sind enzymatisch nicht aktiv. Da *Pseudomonas*-Oxygenase und *Phormia*-

Oxygenase in ihrem Molekulargewicht übereinstimmen, wäre ein ähnlicher Aufbau der beiden Enzyme sehr wahrscheinlich.

Cofaktor

Aus den Spektren von oxydiertem und reduziertem Enzym (S. 47) wird wahrscheinlich, daß ein Eisenporphyrin als Cofaktor für die Oxygenase fungiert. Das Maximum des Differenzspektrums bei 400 nm ist der oxydierten, das Minimum bei ca. 430 nm der reduzierten Form des Enzyms zuzuordnen. Für Säuger- und Bakterienenzym wurden Banden bei 403 und 432 nm gemessen (TANAKA und KNOX, 1959; ISHIMURA et al. 1970). Es ist aber nicht entschieden, ob Hämatin oder ein anderes Eisenprotoporphyrin für die Absorptionsbanden in der Soret-Region verantwortlich ist.

Aus der Säugerleber ist bekannt, daß in vivo nur $1/3$ der Tryptophanoxygenase mit Hämatin abgesättigt ist (WEBER und WISS, 1966) und daß dieser Cofaktor leicht abdissoziiert. Durch Zugabe von Hämatin wird alles Apoenzym katalytisch aktiv. Der Cofaktor der Phormia-Oxygenase dagegen ist, wie die Dialyseversuche und der Erhalt der Aktivität bei Filtration über Sephadex-Säulen zeigen, fest an das Apoenzym gebunden (S. 44). Daher ist es bemerkenswert, daß durch Zugabe von Methämoglobin als Hämatinspender die Aktivität des Enzyms noch auf ca. das 3-fache gesteigert werden kann. Es lägen also auch bei der Oxygenase aus Phormia zwei Formen des Enzyms nebeneinander vor: das aktive Holoenzym und das inaktive Apoenzym, welches aber noch mit dem Cofaktor abgesättigt werden kann. Ein zur Sicherung dieses Befundes wichtiger Kontrollversuch wurde bisher unerwähnt gelassen: Wird Tryptophan mit Hämatin allein unter sonst gleichen Bedingungen in-

kubiert, so wird es nicht umgesetzt; d.h. die zusätzliche Aktivität ist eindeutig enzymatisch.

An dieser Stelle sei kurz auf den stabilisierenden Einfluß des Tryptophans auf die Tryptophanoxygenase eingegangen: PIRAS und KNOX (1967) und KNOX und PIRAS (1967) zeigten durch Dialyse des Enzyms gegen KCl-Lösungen mit und ohne Tryptophan, daß der Cofaktor der Oxygenase aus Rattenlebern in Gegenwart von Tryptophan nicht mehr vom Enzymmolekül abdissoziiert, d.h. der Komplex Enzym-Cofaktor wird durch das Substrat stabilisiert. In vivo ist das Enzym dann auch gleichzeitig gegen Abbau geschützt. Bei erhöhtem Tryptophanspiegel konjugiert in der Leber ein größerer Teil des inaktiven Apoenzyms mit Hämatin zum katalytisch aktiven Holoenzym (KNOX, 1966). Bei gleichbleibender Enzymsynthese steigt daher der Spiegel des aktiven Enzyms in der Leber an; das überschüssige Tryptophan wird abgebaut. Bei Säugern ist dies ein wichtiger Mechanismus der Steuerung des Tryptophanabbaues durch Tryptophan selbst. Bei der Oxygenase aus *Phormia* ist der Cofaktor bereits fest an das Enzymprotein gebunden, sodaß Aktivitätsverluste auf Grund des abdissoziierenden Cofaktors nicht auftreten, wie die Dialyseversuche, die ohne Tryptophan gemacht wurden, zeigen.

Durch EDTA bis zu Konzentrationen von 50 mM wird das Enzym nicht gehemmt, KCN hemmt in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ M/l zu 70% (S. 42). Beachtenswert ist die Hemmung durch Kupfer: Schon bei $1,1 \times 10^{-5}$ M/l wird die Tryptophanoxygenase zu 100% gehemmt. Von besonderem Interesse ist daher, daß nach BRADY und FEIGELSON (1972) Kupfer einen weiteren Cofaktor für das Bakterienenzym darstellt. Die Autoren stellen fest, daß das Kupfer in der reduzierten Form des Enzyms als Cu^+ -Ion vorliegen muß. Andernfalls ist das Enzym katalytisch inaktiv. Das Cu^{++} -Ion hingegen hemmt die Enzymreaktion. BRADY, FEIGELSON und RAJAGOPALAN (1973) schließen daraus, daß für die katalytische Wirksamkeit des

Enzyms primär das Kupfer reduziert werden muß. Der Ladungszustand des Eisens hingegen ist für die Aktivität der Oxygenase erst an 2. Stelle von Bedeutung. Versuche zum Nachweis des Kupfers als Cofaktor für die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* sind auf dem gegenwärtigen Stand der Anreicherung ohne Aussicht auf Erfolg.

Vergleich der Wirkung von Ascorbinsäure und Mercaptoäthanol
MARZLUF (1965a) beobachtete, daß die Oxygenase aus *Drosophila* durch Mercaptoäthanol besser als durch Ascorbinsäure aktiviert wird. Wie aus den Ergebnissen auf S. 15 hervorgeht, wird auch die Oxygenase aus *Phormia* durch beide Reduktionsmittel aktiviert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß kein Unterschied in der Aktivierung durch die beiden Substanzen besteht: Ascorbinsäure hemmt nämlich die BRATTON-MARSHALL-Reaktion stärker als Mercaptoäthanol. Bei Umrechnung auf absolute Farbausbeute ist die Aktivierung des Enzyms in beiden Fällen gleich.

Vergleich zwischen den Tryptophanoxygenasen aus verschiedenen Organismen

Zusammenfassend kann bisher festgestellt werden: Die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* unterscheidet sich in einigen Eigenschaften vom Säuger- und Bakterienenzym: 1. Der Cofaktor ist im Unterschied zum Säuger-, aber in Übereinstimmung mit dem Bakterienenzym fest an das Enzymprotein gebunden und kann durch Dialyse nicht entfernt werden. 2. Das pH-Optimum ist weiter in den alkalischen Bereich verschoben (pH 8,2). 3. Mit $1,25 - 1,33 \times 10^{-3}$ M/l ist die Substratkonzentration bei halbmaksimaler Reaktionsgeschwindigkeit um eine Zehnerpotenz höher,

d.h. die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* hat eine geringere Affinität zu ihrem Substrat als die Säuger- und Bakterienoxygenase.

Gemeinsam für das Enzym aus den verschiedenen Organismen sind dagegen folgende Eigenschaften: 1. Das Enzym reagiert spezifisch nur mit L-Tryptophan; D-Tryptophan und α -Methyltryptophan werden nicht umgesetzt. 2. Die Enzymreaktion wird erst nach einer lag-Phase linear. 3. Das Enzym ist nur im reduzierten Zustand katalytisch aktiv. Dabei ist für das Insektenenzym nicht geklärt, ob Cu^{++} in Cu^+ überführt werden muß. 4. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von unterschiedlichen Substratkonzentrationen ist sigmoid. Die Tryptophanoxygenase ist ein allosterisches Enzym, wobei α -Methyltryptophan als allosterischer Effektor fungieren kann. 5. Mit einiger Wahrscheinlichkeit ist das Enzymmolekül aus 4 Untereinheiten aufgebaut. Das Molekulargewicht liegt bei 120000. 6. Cofaktor der Oxygenase ist ein Eisenporphyrin, höchstwahrscheinlich Hämatin. Ob Kupfer als Cofaktor auch bei dem Enzym aus *Phormia* fungiert, ist offen. 7. Die Sauerstoffaffinität der Enzyme aus den 3 Quellen ist größenordnungsmäßig gleich.

2. Bedeutung der Oxygenase im Stoffwechsel von *Phormia*

Induktion

Säugetiere und Bakterien sind in der Lage, bei erhöhtem Substratangebot mehr Enzymprotein zum Abbau des Tryptophans bereitzustellen (KNOX, 1951; GREENGARD, 1964; SCHIMKE, SWEENEY und BERLIN, 1965). Im Gegensatz dazu kann das Enzym bei *Phormia* nicht induziert werden: Weder bei Larven, denen die 10-fache

Menge ihres Eigengehaltes an Tryptophan, noch bei Imagines, welchen bis zur 40-fachen Menge des freien Tryptophans appliziert wurde, ist eine Zunahme der spezifischen Aktivität innerhalb von 24 Stunden nachzuweisen. Auch bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ist das Enzym nach EGELHAAF (1963) konstitutiv, ebenso bei der Schlupfwespe *Habrobracon* (LEIBENGUTH, 1967a). Dagegen konnten RIZKI und RIZKI (1963) und MARZLUF (1965b) eine Induktion der Oxygenase bei *Drosophila*-Larven in vivo und in vitro nachweisen. Die Kapazität zum Tryptophanabbau ist bei *Phormia* ausschließlich durch die allosterischen Eigenschaften des Enzyms und durch dessen stadienabhängigen Konzentrationsverlauf bestimmt. Unbekannt bleibt weiterhin, ob Folgeprodukte des Tryptophanabbaues regulatorisch auf die Oxygenase einwirken. Vom Enzym aus Rattenleber ist bekannt, daß Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin in Konzentrationen von 5×10^{-5} M/l bereits zu 36% und 85% hemmen (WEBER und WISS, 1966).

Aktivitätsverlauf während der Entwicklung

Die spezifische Aktivität der Tryptophanoxygenase, gemessen in Totalhomogenaten, ist im Larvenstadium hoch, sinkt zur Puppenruhe hin ab, um dort einen Minimalwert zu erreichen, und steigt während des Imaginallebens wieder an. Der damit erhaltene U-förmige Kurvenverlauf ist für viele Enzyme beobachtet worden. Man könnte nun vermuten, daß dieser U-förmige Aktivitätsverlauf der Tryptophanoxygenase nicht durch einen wechselnden Spiegel des Apoenzyms verursacht wird. Es wäre vielmehr denkbar, daß während der Metamorphose Stoffe entstehen, die in vitro das

Enzym hemmen. GHOSH und FORREST (1967) zeigten, daß Pteridine die Tryptophanoxygenase hemmen können; BAILLIE und CHOVIK (1971) fanden nach Homogenisation mit Aktivkohle die Aktivität um das 2-fache erhöht und JACOBSON (1971) schließlich konnte eine Tyrosin-t-RNS als Hemmstoff der Tryptophanoxygenase in supprimierbaren vermilion-Mutanten von *Drosophila* identifizieren. Die unterschiedlichsten Substanzen - Cu^{++} , Pteridine, Nukleinsäuren - sind also imstande, die Aktivität des Enzyms herabzusetzen.

Für die Oxygenase aus *Phormia* konnte ein stadienspezifischer Hemmstoff ausgeschlossen werden: Puppenhomogenate (die einen solchen Hemmstoff besitzen könnten) wurden mit Imaginalhomogenaten gemischt. In Gegenwart eines Inhibitors sollte auch die Aktivität des Imaginalenzym herabgesetzt werden. Wie aus Abb. 30 hervorgeht, sinkt die Aktivität der Oxygenase aus Imagines aber lediglich proportional mit dem Anteil an Puppenprotein ab. Für Absättigung des Enzyms mit Cofaktor wurde in allen Versuchen gesorgt. Dieser Befund, der durch Mischversuche mit AS-Niederschlägen aus beiden Stadien bestätigt wird, zeigt eindeutig, daß nicht ein Hemmstoff, sondern das geringe Angebot an Apoenzym während der Puppenruhe für die niedrige Aktivität der Oxygenase verantwortlich ist. Dies sollte dennoch durch den Vergleich genügend hoch angereicherter Enzympräparationen beider Stadien und durch immunochemische Untersuchungen abgesichert werden.

Vorkommen der Tryptophanoxygenase in verschiedenen Organen

In 7 Tage alten Larven und ca. 7 Tage alten Imagines wird das

Enzym in allen untersuchten Organen gefunden (S. 53). Das steht in guter Übereinstimmung mit Befunden von LINZEN (1971) an *Bombyx mori*. Bei Larven findet sich die höchste spezifische Aktivität in den Malpighischen Gefäßen, die höchste Gesamtaktivität (Tab. 9) aber im Fettkörper. Der Fettkörper, das wichtigste Gewebe für den Intermediärstoffwechsel bei Insekten, besitzt auch bei den Imagines die höchste Gesamtaktivität. Beachtenswert ist der hohe Unterschied der spezifischen Aktivitäten von Ovarien und Hoden.

Aus der Summe der Gesamtaktivitäten der einzelnen Organe pro Tier ergibt sich, daß 1 Fliege pro Stunde ca. 45 nMol Tryptophan umsetzen könnte, wenn optimale Bedingungen, insbesondere optimale Substratkonzentration vorlägen. Bezogen auf g Frischgewicht würde also maximal ca. 1 µMol Tryptophan/Stunde umgesetzt. Werte dieser Größenordnung werden auch für das Enzym aus Säugern (KNOX und MEHLER, 1950; FEIGELSO. und GREENGARD, 1961), das Enzym aus Hühnern (KUNTE, 1960), für das Enzym aus *Drosophila* (KAUFMAN, 1962) und die Oxygenase aus *Ephestia* (EGEL-HAAF, 1963) angegeben. Die Aktivität der Tryptophanoxygenase ist also bei allen untersuchten Organismen größenordnungsmäßig gleich. Die in vitro unter optimalen Bedingungen gemessene Aktivität ist also wesentlich höher als der Umsatz in vivo, der sich ja im Puppenstadium aus einer Tryptophanbilanz, in welche freies und gebundenes Tryptophan eingehen, ohne weiteres berechnen läßt.

Schließlich sei die Frage angeschnitten, ob larvale und imaginale Tryptophanoxygenase bei *Phormia* identisch sind. LEVINEBOOK,

BAUER und SHIGEMATSU (1973) fanden bei *Phormia regina*, daß die Aldolase aus Muskeln von Larven oder Imagines sich nicht in ihren kinetischen Eigenschaften und physiko-chemischen Charakteristika unterscheidet, daß Larval- und Imaginalenzym also identisch sind. Sie nehmen daher an, daß die Aldolase in jedem Entwicklungsstadium vom gleichen Strukturgen codiert wird. In Anbetracht der völligen Umstrukturierung der Gewebe durch Histolyse und Morphogenese während der Metamorphose der Insekten wäre das Auftreten unterschiedlicher Formen eines bestimmten Enzyms durchaus in Betracht zu ziehen. Einen Hinweis auf das Vorliegen ein und derselben Form der Tryptophanoxygenase bei *Phormia terraenovae* während der Entwicklung liefern folgende Ergebnisse: Sowohl bei Larven, als auch bei Imagines ist das pH-Optimum des Enzyms 8,2, das Substratoptimum 8 mM Tryptophan. Das Enzym aus beiden Quellen wird durch höhere Substratkonzentrationen gehemmt und zeigt einen sigmoidalen Reaktionsverlauf bei niedrigen Substratkonzentrationen. Der Hill-Parameter als Maß für die Kooperativität ist bei Larval- und Imaginaloxygenase jeweils größer als 2, sodaß in beiden Fällen ein Aufbau aus 4 Untereinheiten gefordert werden muß. Larval- und Imaginalenzym der Tryptophanoxygenase aus *Phormia terraenovae* unterscheiden sich also in den kinetischen Eigenschaften nicht.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Tryptophanoxygenase aus *Phormia terraenovae* konnte 150- bis 200-fach durch Protaminsulfatfällung, Ammonsulfatfällung, Gel-Filtration und Chromatographie über DEAE-Zellulose angereichert werden.

Eigenschaften:

Die Tryptophanoxygenase reagiert spezifisch mit L-Tryptophan, D-Tryptophan wird nicht umgesetzt.

Ihr pH-Optimum liegt bei 8,2, das Substratoptimum ist 8 mM Tryptophan.

Die Enzymreaktion folgt keiner normalen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, sondern ist sigmoidal.

Die Substratkonzentration für halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit (S_{50}) ist für larvales und imaginales Enzym $1,25 - 1,33 \times 10^{-3}$ M/l.

Der Hill-Parameter n , Ausdruck für die Kooperativität eines Enzyms, wurde graphisch und rechnerisch zu $1,89 - 2,33$ bestimmt.

Die Tryptophanoxygenase aus *Phormia* muß daher aus mindestens 3 Untereinheiten bestehen, aus Gründen der Symmetrie sind 4 Untereinheiten wahrscheinlicher.

Das Molekulargewicht der Tryptophanoxygenase wurde durch Gel-Filtration über Sephadex-G-150 zu 120000 bestimmt.

Die Enzymreaktion wird erst nach einer lag-Phase von durchschnittlich 20 min. linear, Vorinkubation mit suboptimaler Substratkonzentration verlängert die lag-Phase. Durch Vorinkubation mit

1 mM α -Methyltryptophan wird die lag-Phase für das Enzym aus *Phormia* bei Inkubation mit 8 mM Tryptophan aufgehoben.

Durch $2,5 \times 10^{-3}$ M/l KCN wird das Enzym zu 70% gehemmt, Kupfer hemmt in einer Konzentration von $1,1 \times 10^{-5}$ M/l zu 100%. EDTA in Konzentrationen bis zu 50 mM übt keinen hemmenden Einfluß auf die Enzymreaktion aus.

Der Cofaktor der Oxygenase ist fest an das Enzymprotein gebunden. Untersuchungen der Proteinspektren in der Soret-Region weisen darauf hin, daß ein Eisenporphyrin als Cofaktor für die Oxygenase fungiert. Hämatin, Häminchlorid und Methämoglobin als Hämatinspender aktivieren das Enzym. Die K_M für Hämatin beträgt $3,25 - 3,85 \times 10^{-7}$ M/l. Höchstwahrscheinlich ist Hämatin Cofaktor für die Oxygenase aus *Phormia*.

Stoffwechselphysiologische Bedeutung:

Die Tryptophanoxygenase wird weder bei Larven, noch bei Imagines durch zusätzliches Substrat induziert.

Der Aktivitätsverlauf während der Entwicklung nimmt einen typisch U-förmigen Verlauf: Im jungen Larvenstadium ist die Aktivität hoch (185 pMol Kynurenin/min. x mg Protein), sinkt in der Puppenruhe auf ca. 20 pMol Kynurenin/min. mg Protein ab und steigt in der Imago auf den ca. 10-fachen Wert an.

Ein spezifischer Hemmstoff, der für die niedrige Aktivität der Tryptophanoxygenase während der Puppenruhe verantwortlich sein könnte, wurde nicht nachgewiesen.

Die Tryptophanoxygenase wird mit unterschiedlichen Aktivitäten in allen untersuchten Organen von Larven und Imagines gefunden.

Einzigste Ausnahme bilden die Augen, in denen scheinbar Aktivität auftritt, welche aber durch bei den alkalischen Inkubationsbedingungen zerfallende Ommochrome vorgetäuscht wird.

Die höchste Gesamtaktivität findet sich bei Larven und Imagines im Fettkörper, sodaß dieses Gewebe wohl hauptsächlich für den Tryptophanabbau verantwortlich ist.

F. L I T E R A T U R

BAGLIONI, C.: Genetic control of tryptophan peroxidase-oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, Lond. 184, 1084 (1959).

- Genetic control of tryptophan pyrrolase in *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Heredity* 15, 87 (1960).

BAILLIE, D.L. u. A. CHOVNIK: Studies on the genetic control of tryptophan pyrrolase in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genetics* 112, 341 (1971).

BRADY, F.O., H.J. FORMAN u. P. FEIGELSON: The role of superoxide and hydroperoxide in the reductive activation of tryptophan-2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 246, 7119 (1971).

- P. FEIGELSON u. K.V. RAJAGOPALAN: Studies of the copper and heme cofactors of *Pseudomonas* L-tryptophan-2,3-dioxygenase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 63 (1973).

- M.E. MONACO, H.J. FORMAN, G. SCHUTZ u. P. FEIGELSON: On the role of copper in activation of and catalysis by tryptophan-2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 247, 7915 (1972).

BRATTON, A.C. u. E.K. MARSHALL: A new coupling component for sulfanil-amide determination. *J. Biol. Chem.* 128, 537 (1939).

- BROWN, K.S.: A new L- -aminoacid from Lepidoptera. J. Amer. chem. Soc. 87, 4202 (1965).
- u. D. BECHER: The mass spectra of the kynurenines. Tetrahedron Lett. 1967, 1721 (1967).
- BUTENANDT, A.: Über Ommochrome, eine Klasse natürlicher Phenoxazon-Farbstoffe. Angew. Chemie 69, 16 (1957).
- CHEPURKA, W.: Metabolism of nitrogenous and lipid compounds in insects. H. Metabolism of tryptophan. In: M. ROCKSTEIN: The Physiology of Insecta, Bd. II, S. 706 ff. New York - London: Academic Press 1965.
- CHO-CHUNG, Y.S. u. H.C. PITOT: Feedback control of rat liver tryptophan pyrrolase. J. Biol. Chem. 242, 1192 (1967).
- GIVEN, M. u. W.E. KNOX: The specificity of tryptophan analogues as inducers, substrates, inhibitors, and stabilizers of tryptophan pyrrolase. J. Biol. Chem. 235, 1716 (1960).
- CLOUET, D.H. u. M.W. GORDON: The effect of tryptophan on the tryptophanperoxydase activity of cell-free systems from rat liver. Arch. Biochem. 84, 22 (1959).
- EGELHAAF, A.: Nachweis eines genabhängigen L-Tryptophanoxydase-Systems bei Ephestia kühniella. Z. Naturforsch. 13b, 275 (1958).
- Über das Wirkungsmuster des a-Locus von Ephestia kühniella. Z. Vererbungsl. 24, 349 (1963).
- FEIGELSON, P. u. O. GREENGARD: A microsomal iron-porphyrin activator of rat liver tryptophan pyrrolase. J. Biol. Chem. 236, 153 (1961).
- Y. ISHIMURA u. O. HAYAISHI: Studies on the role of hematin in the catalytic mechanism of tryptophan pyrrolase. Biochim. Biophys. Acta 26, 283 (1965).
- FORMAN, H.J. u. P. FEIGELSON: The effects of allosteric interaction on the kinetics, spectra, and tertiary structure of Pseudomonas tryptophan oxygenase. J. Biol. Chem. 247, 256 (1972).

- FRANZ, J.H. u. W.E. KNOX: The effect of development and hydrocortisone on tryptophan oxygenase, formamidase, and tyrosine aminotransferase in liver of young rat. *Biochemistry* 6, 3464 (1967).
- GHOSH, D. u. M.S. FORREST: Inhibition of tryptophan pyrrolase by some naturally occurring pteridines. *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 578 (1967).
- GILMOUR, D.: *The Biochemistry of Insects*. New York - London: Academic Press 1961.
- GREENGARD, O.: Tryptophan analogues and the mechanism of induction of rat-liver tryptophan pyrrolase, in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 85, 492 (1964).
- u. P. FEIGELSON: The activation of the inducible enzyme, rat-liver tryptophan pyrrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 22, 191 (1960).
 - u. P. FEIGELSON: The activation and induction of rat liver tryptophan pyrrolase in vivo by its substrate. *J. Biol. Chem.* 236, 158 (1961).
 - u. P. FEIGELSON: The purification and properties of liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.* 237, 1903 (1962).
- HILL, A.V.: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissoziation curves. *J. Physiol.* 40, IV - VII (1910).
- HENDERSON, L.M., R.K. GHOLSON u. C.E. DALGLIESH: Metabolism of aromatic amino acids. In: M. FLORKIN u. H.S. MASON: *Comparative Biochemistry*, Bd. 4, S. 288 ff. New York - London: Academic Press 1962.
- ISHIMURA, Y., M. NOZAKI, O. HAYASHI, T. NAKANURA, M. TAMURA u. J. YAMAZAKI: The oxygenated form of L-tryptophan 2,3-dioxygenase as reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 245, 3593 (1970).

- JACOBSON, K.B.: Role of an isoacceptor transfer ribonucleic acid as an enzyme inhibitor: effect on tryptophan pyrrolase of *Drosophila*. *Nature New Biol.* 231, 17 (1971).
- KAUFMAN, S.: Studies on tryptophan pyrrolase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 47, 807 (1962).
- KNOX, W.E.: 1950, siehe KNOX, W.E. u. A.H. MEHLER (1950).
- KNOX, W.E.: Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaption and stimulation of the pituitary-adrenal system. *Brit. J. exp. Pathol.* 32, 462 (1951).
- The regulation of tryptophan pyrrolase activity by tryptophan. *Adv. Enzyme Regul.* 4, 287 (1966).
 - u. A.H. MEHLER: The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. *J. Biol. Chem.* 187, 419 (1950).
 - u. M.M. PIRAS: Tryptophan pyrrolase of liver. III. Conjugation in vivo during cofactor induction by tryptophan analogues. *J. Biol. Chem.* 242, 2959 (1967).
 - M.M. PIRAS u. K. TOKUYAMA: Tryptophan pyrrolase of liver. I. Activation and assay in soluble extracts of rat liver. *J. Biol. Chem.* 241, 297 (1966).
- KOIKE, K. u. P. FEIGELSON: Studies on the catalytic and allosteric sites in modulating the reactivity of tryptophan oxygenase with heme ligands. II. Carbon monoxide derivatives. *Biochemistry* 10, 3385 (1971).
- W.N. POILLON u. P. FEIGELSON: Influence of allosteric effector substances on the structure and catalytic activity of tryptophan oxygenase. *J. Biol. Chem.* 244, 3457 (1969).
- KUMTE, H.: Vergleichende Untersuchungen zum Tryptophanstoffwechsel in Leberzellfraktionen bei Wirbeltieren. *Z. vergl. Physiol.* 43, 341 (1960).

- LAN, S.J. u. R.K. GHOLSON: A comparative study of tryptophan catabolism. J. Biol. Chem. 240, 3934 (1965).
- LANCASTER, G.A. u. T.L. SOURKES: Effect of alpha-methyl-DL-tryptophan on tryptophan metabolism of *Musca domestica* L. Comp. Biochem. Physiol. 28, 1435 (1969).
- LEIBENGUTH, F.: Regulation of tryptophan metabolism in the parasitic wasp, *Habrobracon juglandis*. Experientia 23, 1069 (1967a).
- Entwicklungsphysiologisch-genetische Untersuchungen am Tryptophanstoffwechsel zweier Genotypen von *Habrobracon juglandis* ASHMAED. Wilhelm Roux' Arch. 158, 246 (1967b).
- LEVENBOOK, L., A.C. BAUER u. H. SHIGEMATSU: Fructose diphosphate aldolase during growth and development of the blowfly *Phormia regina* (MEIGEN). III. Physicochemical comparison of the larval and adult muscle enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 157, 625 (1973).
- LINZEN, B.: Zur Biochemie der Ommochrome: Unterteilung, Vorkommen, Biosynthese und physiologische Zusammenhänge. Naturwissenschaften 54, 259 (1967).
- Autonomes Verhalten Tryptophan-abbauender Enzyme während der Metamorphose von *Bombyx mori* L.: Lokalisation und zeitlicher Verlauf der Tryptophanpyrrolase. Wilhelm Roux' Arch. 168, 320 (1971).
 - The tryptophan - ommochrome pathway in insects. Adv. Insect Physiol. 10, im Druck (1973).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR u. R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- MAENO, H. u. P. FEIGELSON: Spectral studies on the catalytic mechanism of *Pseudomonas* tryptophan oxygenase (tryptophan pyrrolase). J. Biol. Chem. 242, 596 (1967).
- MARZLUF, G.A.: Tryptophan pyrrolase of *Drosophila*: partial purification and properties. Z. Vererbungslehre 97, 10 (1965a).

- MARZLUF, G.A.: Enzymatic studies with the suppressor of vermilion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 52, 503 (1965b).
- MAYHEW, S.G. u. L.G. HOWELL: Chromatography of proteins on diethylaminoethylcellulose in concentrated ammonium sulfate. *Anal. Biochem.* 41, 466 (1971).
- MONOD, J., J. WYMAN u. J.P. CHANGEUX: On the nature of allosteric transition. *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965).
- MORTON, R.K.: Methods of extraction of enzymes from animal tissues. In: S.P.COLOWICK u. N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology*, Bd. I, S. 33. New York: Academic Press 1955.
- NAWA, S.: Purification and properties of tryptophan pyrrolase in *Ephestia*. *Ann. Rep. Nat. Inst. Gen.* 21, 24 (1970).
- PINAMONTI, S. u. A. PETRIS: Studies on tryptophan pyrrolase of *Schistocerca gregaria* FÖRSK. (Orthoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 1079 (1966).
- A. PETRIS u. G. COLOMBO: Nucleic acids, proteins, and tryptophan pyrrolase activity of the fat body of *Schistocerca gregaria* FÖRSK. (Orthoptera) during ovarian maturation. *J. Insect Physiol.* 12, 1403 (1966).
- PIRAS, M.M. u. W.E. KNOX: Tryptophan pyrrolase of liver. II. The activation reactions in crude preparations from rat liver. *J. Biol. Chem.* 242, 2952 (1967).
- POILLON, W.N., H. MAENO, K. KOIKE u. P. FEIGELSON: Tryptophan oxygenase of *Pseudomonas acidovorans*. Purification, composition, and subunit structure. *J. Biol. Chem.* 244, 3447 (1969).
- RIZKI, T.M.: Mutant genes regulating the inducibility of kynurenine synthesis. *J. Cell Biol.* 21, 203 (1964).
- u. R.M. RIZKI: An inducible enzyme system in the larval cells of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 17, 87 (1963).

- SCHARTAU, W.: Zur Frage der Verteilung und Verwertung von Tryptophan bei der Schmeißfliege *Phormia regina* und anderen Insekten. Diplomarbeit, München 1970.
- u. B. LINZEN: Tryptophan wird von Insekten nicht veratmet. *Naturwissenschaften* 56, 329 (1969).
- SCHIMKE, R.T., E.W. SWEENEY u. C.M. BERLIN: Studies of the stability in vivo and in vitro of rat liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.* 240, 4609 (1965).
- SEGEL, J.H.: Biochemical calculations. New York - London - Sidney - Toronto: John Wiley & Sons, Inc. 1968.
- SEGLIN, P.O. u. K.F. JERVELL: Tryptophan oxygenase activation and ascorbate oxidation in whole homogenates from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 171, 47 (1969).
- SHINOHARA, R. u. J. ISHIGURO: The purification and properties of formamidase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 198, 324 (1970).
- STEVENSON, E. u. G.R. WYATT: The metabolism of silkworm-tissues. I. Incorporation of leucine into protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 65 (1962).
- TANAKA, T. u. W.E. KNOX: The nature of mechanism of the tryptophan pyrrolase (peroxidase-oxidase) reaction of *Pseudomonas* and of rat liver. *J. Biol. Chem.* 234, 1162 (1959).
- TARTOF, K.D.: Interacting gene systems: I. The regulation of tryptophan pyrrolase by the vermilion-suppressor of vermilion system in *Drosophila*. *Genetics* 62, 781 (1969).
- TIEDT, S.: Untersuchungen zum Tryptophanabbau in der Entwicklung von *Gryllus bimaculatus* DE GEER. Diplomarbeit, München 1971.
- TOKUYAMA, K.: Further studies on bacterial and liver tryptophan pyrrolases. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 76 (1968).

- UMEBACHI, Y. u. K. YOSHIDA: Some chemical and physical properties of papiliochrome II in the wings of *Papilio xuthus*. *J. Insect Physiol.* 16, 1203 (1970).
- WEBER, F. u. O. WISS: Am Tryptophanstoffwechsel beteiligte Enzyme. In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der Physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., Bd VI/B, S. 823 ff. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1966.
- WESSING, A. u. A. BONSE: Untersuchungen über die Speicherung und Ausscheidung von freiem Tryptophan durch die Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturforsch.* 17b, 620 (1962).
- WOLVEKAMP, H.P.: Über den Sauerstofftransport durch Hämocyanin von *Octopus vulgaris* LAM. und *Sepia officinalis* L. *Z. vergl. Physiol.* 25, 541 (1938).
- ZIEGLER, I.: Genetic aspects of ommochrome and pterine pigments. *Adv. Gen.* 10, 349 (1961).

LEBENS LAUF

Ich wurde am 21. 11. 1943 als Sohn des Biologen Dr. Otto Schartau und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Knecht, in Oberstaufen geboren. Mein Vater ist 1944 in Jugoslawien gefallen. Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Oberstaufen und anschließend die Oberrealschule in Kempten (Allgäu). Dort legte ich im Juli 1963 das Abitur ab. Im November des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Biologie in München. Im Wintersemester 1967/68 legte ich die Prüfung für das Vordiplom (Zoologie, Botanik, Genetik, Chemie) und das Hauptdiplom (Zoologie, Biochemie, Genetik, Chemie) ab. Im Februar 1970 beendete ich die Diplomarbeit (Thema: Zur Frage der Verteilung und Verwertung von Tryptophan bei der Schmeißfliege *Phormia regina* und anderen Insekten) und begann die vorliegende Promotionsarbeit.

